



HAL
open science

Étude de l'interaction entre les peroxysomes et le virus de l'hépatite C

Esther Martin de Fourchambault

► **To cite this version:**

Esther Martin de Fourchambault. Étude de l'interaction entre les peroxysomes et le virus de l'hépatite C. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS036 . tel-04338608

HAL Id: tel-04338608

<https://theses.hal.science/tel-04338608>

Submitted on 12 Dec 2023

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'UNIVERSITÉ DE LILLE

Etude de l'interaction entre les peroxysomes et le virus de l'hépatite C.

*Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS
UMR9017, Institut Pasteur de Lille, équipe Virologie Moléculaire et
Cellulaire.*

Présentée et soutenue publiquement le 3 novembre 2023 par

Esther Martin de Fourchambault

Sous la direction du Dr **Yves Rouillé**

Membres du jury :

Président du jury

Pr François Helle

Rapportrice

Dr Annette Martin

Rapporteur

Dr Joachim Lupberger

Examinatrice

Dr Birke Bartosch

Directeur de thèse

Dr Yves Rouillé

A force de se planter, un beau jour, on devient une fleur.

Ou un docteur.

Remerciements

J'ai souvent pensé au moment où j'écrirais ces lignes, mais il me paraissait si lointain que je ne réalise pas encore tout à fait que ça y est, c'est la fin. Quelle aventure ! Quatre ans de vie, plusieurs dizaines de pages écrites, et me voilà, balbutiante à l'idée de dire à mes proches que je les aime. Quand je regarde en arrière, mes souvenirs des derniers mois sont assez flous et je suis presque prise de panique. Je me sens comme à la fin d'un livre, lorsqu'on se demande ce qu'on va faire de sa vie maintenant que notre occupation principale arrive à son terme. Mais j'en ai tellement rêvé, de ce monde d'après-thèse. Plus question de reculer, il est temps de le dévorer.

En premier lieu, je veux remercier Annette Martin, Birke Bartosch, Joachim Lupberger et François Helle d'avoir accepté de constituer le jury de cette thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

J'en profite pour remercier Yasmine Sebti et à nouveau François Helle pour m'avoir suivie au cours de cette longue aventure qu'est le doctorat au travers des CSI. Vous avez été d'une grande aide.

J'aimerais ensuite remercier chaleureusement Jean Dubuisson d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire. Jean, cher Grand-Schtroumpf, merci de ton suivi tout au long de ces quatre ans, merci pour toutes tes connaissances en virologie, et merci infiniment d'avoir relu mon manuscrit et de m'avoir prodigué autant de bons conseils.

Je tiens tout particulièrement à remercier Yves Rouillé pour avoir bien voulu diriger cette thèse. Yves, à ton contact j'ai beaucoup appris, surtout des choses que je ne m'attendais pas à apprendre.

Je tiens aussi à remercier Nathalie Callens, qui a participé à mon suivi et m'a beaucoup aidée, notamment concernant la biologie moléculaire (où ma poisse légendaire devenait quelque peu handicapante). Nathalie, merci de m'avoir accompagnée pendant quatre ans, de m'avoir toujours donnée tes retours et de m'avoir aidée à prendre du recul quand j'en avais besoin.

J'aimerais remercier de tout mon cœur Laurence Cocquerel, qui a elle aussi participé à mon suivi. Laurence, tu m'as recueillie au sein de l'équipe HEV lorsque je me sentais orpheline et m'as permis de me sentir soutenue humainement et scientifiquement. Tu es une femme inspirante et une responsable admirable, qui a su comme personne créer un esprit d'équipe au sein du groupe HEV. Je suis heureuse d'avoir croisé ta route.

J'y associe tous les membres de l'équipe HEV, qui m'ont si gentiment acceptée comme l'une des leurs et m'ont prodigué leurs remarques et conseils, toujours avec beaucoup de bienveillance. Merci de tout cœur à Cécile-Marie Aliouat-Denis, maman-Claire Montpellier, Martin Ferrié, Kevin Hervouet, Virginie Alexandre, Charline Camuzet, Karoline Metzger et Cyrine Bentaleb pour votre accueil chaleureux et tous

nos échanges. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir, que je n'imagine autrement que brillant.

J'aimerais également remercier Anne Goffard, qui malgré son emploi du temps plus-que-chargé de Wonder Woman ne sachant pas choisir entre dix-huit vies à mener de front, a bien voulu m'accorder du temps quand je me sentais perdue. Anne, ton franc-parler m'a poussée à fonder ton fan-club. Tu es une femme inspirante qui comptera toujours parmi mes modèles.

J'aimerais dans l'ensemble remercier toute l'équipe MCV pour leur accueil, leur bienveillance et leurs conseils. Merci à vous tous pour vos pots, gâteaux, petites attentions et tous les moments de convivialité que nous avons pu partager.

Je souhaite évidemment bon courage à la relève. Léa, on te confie les clés, maintenant c'est à toi de tenir le fort ! Je te lègue ma fresque de post-it, c'est à ton tour de perpétuer mon œuvre et de participer à son rayonnement dans tout l'IBL. N'oublie pas non plus d'emmener Chouchou en congrès, le pauvre s'est senti un peu seul durant le COVID.

Il est maintenant temps de remercier mes plus-que-collègues, ceux qui m'ont accompagnée pendant les pauses-midi, ceux avec qui j'ai ri, pleuré, râlé, et encore ri :

Merci à Karoline Metzger. Kari, j'ai adoré chaque minute de nos entraînements ensemble et voir la montagne de tes biceps grandir à vue d'œil. Merci de m'avoir écoutée, soutenue, et d'avoir été un exemple d'indépendance. Merci d'avoir été toi tout simplement.

Merci à Cyrine Bentaleb. Cycy, pardon...DOCTEURE Bentaleb, tu as été une amie douce et compréhensive. Je te remercie pour toutes les discussions que nous avons partagées et ton recul sur la vie. Je suis heureuse que tu ne sois pas partie trop loin de nous après ta thèse et j'espère te revoir très vite.

Merci à Charline Camuzet. Charline, tu es la personne la plus franche que je connaisse. J'ai adoré nos moments de fou-rires et nos discussions interminables à propos de nos animaux de compagnie. J'embrasse la patate pour toi, promis.

Merci à Imelda Raczkiewicz. Imelda, tu es tout bonnement adorable. Tu t'es montrée douce et empathique, mais surtout tellement drôle. J'ai beaucoup apprécié les après-midi jeux de société passés chez toi, Walid et Romy (qui est le spitz le plus adorable de toute la création). J'espère te revoir encore souvent.

Merci à Peggy Bouquet. Peggy, tu es une perle. Nos discussions m'ont beaucoup apportée d'un point de vue personnel, et la bonne ambiance de notre bureau m'a aidée à tenir le coup dans les moments difficiles. Merci d'avoir partagé avec moi tes expériences professionnelles, personnelles et ton vécu si riche. Tu fais preuve d'une ouverture d'esprit et d'une curiosité remarquables et rafraîchissantes, et tes récits de voyage m'ont souvent transportée. Je crois que quelque part, quand je serai grande, je voudrais un peu être Peggy.

Merci à Virginie Alexandre. Virginie, tu es une personne douce et compréhensive, mais qui ne se laisse pas faire (et ça, j'adore). Tu me fais beaucoup penser à ma mère. Nos discussions me manqueront.

Merci à Audrey Tarricone. Audrey, ton arrivée récente dans l'équipe a amené un vent de fraîcheur qui nous a tous fait un bien fou. Tu es solaire. Merci d'avoir été ma meilleure rivale sur les terrains de badminton, merci pour tes cookies addictifs, merci d'avoir autant ri.

Merci à Adeline Danneels. Adeline, merci pour les moments que nous avons partagés, merci surtout pour ton humour et pour m'avoir parfois aidée à voir les choses sous un angle nouveau. Je te souhaite le meilleur.

Merci à Dylan Juckel. Dylan, que dire ? Quelle aventure ! Merci pour tes granola anti-dépresseurs, merci pour tes « tu veux voir les photos de l'écho ? » quand j'avais un coup de mou, merci d'avoir souffert, douté, râlé, stressé avec moi, particulièrement pendant les dernières semaines de rédaction. Nous sommes définitivement les deux faces d'une même pièce. Je te souhaite une réussite exceptionnelle au Canada avec ta famille, et j'ai hâte d'assister à ta soutenance.

J'aimerais maintenant remercier mes amis, ceux qui ont rendu ma vie plus belle pendant ces quatre ans. Je pense que vous ne vous figurez pas à quel point chacun des moments passés ensemble a compté pour moi. Les amis, vous êtes le sel de la vie.

Merci à Laura Leprevost et Quentin Morel. Les amis, votre rencontre a été une claque. Laura, je te remercie pour ta bonne humeur, ta personnalité attachante, ton humour, tes grimaces, ton énergie, et toutes les sorties que tu as organisées. Tu es une personne en or, une véritable amie, et je suis fière d'être officiellement la tante de Maki. J'ai hâte de te voir défendre brillamment ta thèse et de te coopter dans ma future équipe !

Quentin, tu es une des personnes les plus intéressantes que je connaisse. Merci pour nos discussions concernant la santé mentale, la politique, la musique... Tu es une personne stimulante et empathique, qui me pousse à mieux me renseigner, mieux argumenter, mieux réfléchir, mais qui m'a aussi fait me sentir entendue et comprise. J'espère pouvoir un jour te rendre la pareille.

Merci à Kamel Djaout. Kamel, tu as été là dans les bons et les mauvais moments, plus que n'importe quel autre ami. Je te remercie de m'avoir supportée en train de râler, même quand je radotais façon disque rayé. Je te remercie pour tous les moments passés ensemble, à ne rien faire de particulier, juste être ensemble. J'espère te revoir bientôt.

Merci à Carine Chabrier. Carine, tu es ma plus ancienne amie. Merci d'avoir été ma confidente, merci d'avoir été un réel soutien pendant les années COVID, merci d'être aussi bienveillante dans nos discussions, merci pour tes conseils, ta bonne humeur, ta sincérité, et toutes nos discussions passionnantes concernant la psychologie. Merci de m'avoir aidée à tenir le coup dans les moments difficiles, et merci de m'avoir fait confiance. A très vite !

Merci à Majda Hachmi. Majda, Queen, Beauty, tu es une femme exceptionnelle. Tu es drôle, indépendante et généreuse. J'ai adoré nos sorties, la color party, la construction

de Froppy la grenouille-soleil en post-it... J'espère vivre encore de nombreux moments comme ceux-là en ta compagnie.

Merci à Fethi Kither. Fethi, nos parcours ont étrangement été assez parallèles. Merci d'avoir vécu les mêmes choses que moi, souvent au même moment, d'avoir été confronté aux mêmes difficultés, aux mêmes doutes, aux mêmes découragements. J'ai hâte d'assister à ta soutenance, que j'aperçois déjà glorieuse.

Merci à Oriane Rivière. Oriane, merci d'avoir été à l'initiative d'autant de super moments tous ensemble, merci de nous avoir tous mis à la pétanque le temps d'un été. Je te souhaite le meilleure pour la fin de ta thèse.

Merci à Dacine Osmani. Dacine, je sais que tout le monde le dit, mais c'est vrai : tu es un véritable soleil. Une boule d'énergie positive et de mauvaise foi à la pétanque. Tu es pétillante et rafraîchissante, j'espère te recroiser encore souvent !

Merci à Guillaume Camus. Guillaume, cher petit Ange de Fourvière, merci d'être aussi tolérant avec nous malgré tout ce qu'on te fait subir. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la thèse qui s'annonce.

Merci au clan Costa : Maxime, Bérénice, Charlotte. Je ne vous ai rencontré que récemment, mais vous êtes addictifs. J'ai hâte d'apprendre à vous connaître de mieux en mieux, j'ai adoré tous les moments passés avec vous. Je vous souhaite à tous les trois beaucoup de courage et de réussite.

Je tiens aussi à remercier ma famille, qui m'a soutenue durant toutes mes études, m'a entourée d'amour et a accepté de braver le grand Nord pour venir assister à ma soutenance. J'espère avoir réussi à vous rendre fiers.

Merci à ma sœur, Lola Martin de Fourchambault. Ma sœur, ma sœur préférée (et pas seulement parce que je n'en ai qu'une), ma sœur au prénom si bien choisi (et pas seulement parce que c'est moi qui l'ai trouvé), notre relation est si particulière. J'ai l'impression qu'on a tout vécu et tout surmonté ensemble, tellement que parfois il n'y a qu'à toi que je peux confier mes émotions, tu es la seule personne que je veux voir quand je me sens mal. Merci d'avoir été là au téléphone quand je craquais, merci d'être venue me voir aussi souvent, merci de m'avoir aidée et encouragée dans mes candidatures, merci d'avoir ri, et pleuré, et ri en pleurant, merci d'être ma sœur. Je t'aime de tout mon cœur, et te remercie chaque jour de m'accorder une place dans ta vie. You the best ♥ (and I'm not crying, you are).

Merci à mon conjoint, Alessandro Cecotti. Aless, tu me connais, je suis gênée à l'idée d'écrire publiquement tout l'amour et toute la gratitude que je voudrais t'exprimer. Cela fait plus de neuf ans que tu me supportes. Nous avons grandi ensemble, évolué ensemble, nous nous sommes émancipés ensemble, j'ai maintenant hâte que l'on vieillisse ensemble. Merci de ne pas m'avoir lâchée pendant ces quatre années difficiles. Merci de m'avoir rassurée quand je me réveillais en pleurs la nuit, merci de m'avoir toujours encouragée à continuer, merci de m'avoir supportée pendant mes crises de nerfs, merci de m'avoir aidée à garder confiance en moi, merci de m'avoir soutenue jusqu'à ce qu'on arrive au bout de cette fichue thèse. Je n'aurais jamais pu y arriver sans toi, merci infiniment pour tout. Cette journée, on la baise. Je t'aime.

Table des matières

Table des figures.....	12
Table des tableaux.....	14
Résumé français	1
English abstract	2
Abréviations	3
Introduction.....	13
I- L'Hépatite C	14
A- Description de la maladie.....	14
1) 1970 : une nouvelle hépatite ?.....	14
2) Epidémiologie de l'hépatite C	14
3) Transmission de la maladie	16
4) Pathogénèse.....	18
a) Forme aiguë.....	18
b) Forme chronique	19
c) Manifestations extrahépatiques.....	20
d) Hépatite C et comorbidités associées	21
B- Le virus de l'hépatite C	26
1) Description de l'agent pathogène	26
a) Phylogénie et classification d'HCV	26
b) Le génome d'HCV	28
c) Protéines structurales	29
d) Protéines non-structurales.....	32
e) La particule virale	39
2) Modèles d'étude d'HCV.....	41
a) Les modèles d'étude ex vivo	41
b) Les modèles animaux	45
3) Le cycle cellulaire d'HCV.....	52
a) Entrée de la particule virale dans la cellule-hôte	52
b) Réplication et traduction.....	55
c) Assemblage et sortie des virions	59
4) Avancées dans la lutte contre le virus.....	61
a) Dépistage de l'hépatite C	61
b) Traitement de l'hépatite C	63
c) Perspectives vaccinales	66

C-	Pathogenèse au niveau cellulaire.....	69
1)	Impact d’HCV sur la morphologie des organelles	70
2)	Altération du métabolisme cellulaire.....	71
a)	Induction de l’autophagie	71
b)	Altération du métabolisme des lipides.....	72
c)	Perturbation du réticulum endoplasmique et stress réticulaire.....	73
d)	Perturbation des mitochondries et stress oxydatif.....	75
e)	Altération des fonctions peroxysomales.....	76
II-	Peroxisomes	77
A-	Nature et fonction des peroxysomes.....	77
1)	Description des peroxysomes.....	77
a)	Biogenèse des peroxysomes	78
b)	Import des protéines membranaires	80
c)	Import des protéines matricielles	81
d)	Dégradation des peroxysomes.....	83
2)	Fonction des peroxysomes.....	85
a)	Métabolisme des lipides.....	85
b)	Régulation des espèces réactives de l’oxygène	90
c)	Immunité innée	91
d)	Détoxification du glyoxylate.....	92
3)	Interactions avec les autres organelles.....	93
a)	Réticulum endoplasmique.....	94
b)	Mitochondries	96
c)	Gouttelettes lipidiques.....	98
d)	Lysosomes	99
B-	Maladies peroxysomales.....	100
1)	Maladies génétiques	100
a)	Troubles du spectre de Zellweger	100
b)	Adrénoleucodystrophie liée à l’X	105
c)	Maladie de Refsum non-infantile.....	106
2)	Maladies liées au vieillissement	106
a)	Diabète de type 2	107
b)	Maladies neurodégénératives.....	107
c)	Cancer.....	108
3)	Peroxisomes et virus.....	110
a)	Désamorçage de l’immunité innée antivirale	110

b) Les herpesvirus induisent la prolifération des peroxysomes	112
c) SARS-CoV-2 et peroxysomes	113
d) HIV induit la déplétion des peroxysomes.....	114
e) Les flavivirus induisent la déplétion des peroxysomes	114
f) Et HCV ?	115
Projet de thèse	117
Résultats préliminaires et objectifs du projet	118
Matériels et méthodes	121
Résultats	131
Le recrutement des peroxysomes est indépendant d'ACBD5.....	131
Le virus de l'hépatite C altère la morphologie des peroxysomes	133
Impact d'HCV sur l'expression des protéines peroxysomales.....	136
Les peroxysomes ne sont pas nécessaires au cycle cellulaire d'HCV	138
L'infection impacte le fonctionnement des peroxysomes	143
Discussion	146
Bibliographie.....	152
Annexe.....	184

Table des figures

<u>Figure 1</u> : prévalence de l'hépatite C dans le monde.....	16
<u>Figure 2</u> : évolution des atteintes hépatiques causées par l'hépatite C.....	19
<u>Figure 3</u> : manifestations extra-hépatiques.....	21
<u>Figure 4</u> : impact d'HIV sur la progression des symptômes hépatiques lors d'une co-infection HIV-HCV.....	23
<u>Figure 5</u> : arbre phylogénétique de la famille des <i>Flaviviridae</i>	27
<u>Figure 6</u> : répartition géographique des différents géotypes d'HCV.....	27
<u>Figure 7</u> : structure du génome du virus de l'hépatite C.....	29
<u>Figure 8</u> : structure de la protéine core.....	31
<u>Figure 9</u> : schéma des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	32
<u>Figure 10</u> : structure hexamérique du canal ionique formé par p7.....	33
<u>Figure 11</u> : structure de la protéine NS2.....	34
<u>Figure 12</u> : représentation du complexe NS3-4A.....	35
<u>Figure 13</u> : schéma de la structure d'NS4B associée à la membrane du RE.....	36
<u>Figure 14</u> : représentation schématique de la structure d'NS5A.....	38
<u>Figure 15</u> : représentation schématique linéaire et 3D d'NS5B.....	39
<u>Figure 16</u> : la particule virale.....	40
<u>Figure 17</u> : principe du système réplicon en culture cellulaire.....	42
<u>Figure 18</u> : production des pseudoparticules HCVpp dans les cellules HEK-293T.....	43
<u>Figure 19</u> : production des particules infectieuses HCVcc en culture cellulaire.....	45
<u>Figure 20</u> : principales approches de l'élaboration d'un modèle murin pour l'étude d'HCV.....	47
<u>Figure 21</u> : frise chronologique de la découverte des différents <i>hepacivirus</i>	51
<u>Figure 22</u> : cycle cellulaire du virus de l'hépatite C.....	52
<u>Figure 23</u> : représentation schématique et temporelle des cinq étapes de l'entrée d'HCV.....	55
<u>Figure 24</u> : structure des remaniements membranaires induits par HCV.....	57
<u>Figure 25</u> : schéma du bourgeonnement des LVP dans la lumière du RE.....	60
<u>Figure 26</u> : évolution de l'efficacité des traitements contre d'hépatite C de 1991 à 2016.....	65
<u>Figure 27</u> : schéma des altérations cellulaires présentes dans les hépatocytes.....	69
<u>Figure 28</u> : voies d'induction de l'autophagie par HCV.....	72
<u>Figure 29</u> : la réponse UPR.....	74

<u>Figure 30</u> : biogenèse des peroxysomes par fission.....	80
<u>Figure 31</u> : import des protéines matricielles par interaction avec PEX5.....	82
<u>Figure 32</u> : β -oxydation peroxysomale et mitochondriale.....	86
<u>Figure 33</u> : α -oxydation de l'acide phytanique dans les peroxysomes.....	87
<u>Figure 34</u> : représentation schématique de la synthèse de plasmalogènes.....	89
<u>Figure 35</u> : synthèse du cholestérol.....	90
<u>Figure 36</u> : quantification des peroxysomes en contact avec d'autres organites.....	93
<u>Figure 37</u> : principales interconnexions entre les peroxysomes et les autres organites.....	94
<u>Figure 38</u> : l'interaction entre ACBD5 et les VAP-B permet l'échange de lipides entre les peroxysomes et le RE.....	96
<u>Figure 39</u> : interaction entre les peroxysomes, les mitochondries et le RE.....	98
<u>Figure 40</u> : traits caractéristiques et dysmorphie crâniofaciale d'enfants atteints par un trouble du spectre de Zellweger.....	103
<u>Figure 41</u> : diversité des stratégies virales pour désamorcer l'activation de l'immunité innée par les peroxysomes.....	110
<u>Figure 42</u> : diversité des stratégies virales pour moduler la biogenèse des peroxysomes.....	111
<u>Figure 43</u> : diversité des stratégies virales pour moduler le métabolisme des peroxysomes..	112
<u>Figure 44</u> : ACBD5 est un <i>hit</i> du crible NS5A-APEX.....	119
<u>Figure 45</u> : cinétique d'association es peroxysomes avec les complexes de réplication.....	132
<u>Figure 46</u> : recrutement des peroxysomes à proximité des complexes de réplication d'HCV dans les cellules ACBD5-KO.....	133
<u>Figure 47</u> : altération de la morphologie et de la localisation subcellulaire des peroxysomes	135
<u>Figure 48</u> : altération de la morphologie des peroxysomes dans les cellules infectées par HCV ou contenant un réplicon.....	136
<u>Figure 49</u> : analyse différentielle de l'expression des protéines totales.....	138
<u>Figure 50</u> : infection des cellules PEX5-KO par HCV.....	141
<u>Figure 51</u> : infection des cellules PEX3-KO par HCV.....	142
<u>Figure 52</u> : ratio C16/C26.....	143
<u>Figure 53</u> : augmentation du stress oxydatif en présence d'HCV.....	145

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : comparaison des différents homologues d'HCV.....	51
<u>Tableau 2</u> : protocoles de soin pour traiter l'hépatite C en France.....	66
<u>Tableau 3</u> : liste des enzymes antioxydantes peroxysomales et de leurs substrats chez l'homme.....	91
<u>Tableau 4</u> : liste des gènes responsables des troubles du spectre de Zellweger.....	101

Résumé français

L'hépatite C est une maladie chronique occasionnant une atteinte hépatique évolutive pouvant conduire en 20 ou 30 ans à l'apparition d'une cirrhose ou d'un hépatocarcinome. L'agent pathogène responsable de cette maladie est le virus de l'hépatite C (HCV). C'est un petit virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive qui infecte les hépatocytes humains et se transmet exclusivement par contact sanguin. HCV induit un stress oxydatif et détourne le métabolisme des cellules-hôtes, en particulier le métabolisme des lipides. Pour ce faire, il altère la morphologie et le fonctionnement de nombreuses organelles comme le réticulum endoplasmique, les gouttelettes lipidiques et les mitochondries. Des études récentes suggèrent que les peroxysomes sont également impactés par l'infection par HCV. Les peroxysomes sont de petites organelles sphériques, dynamiques et multifonctionnelles dont le nombre, la taille et la fonction s'adaptent au contexte cellulaire. Ils sont notamment impliqués dans le métabolisme des lipides, le maintien de l'équilibre redox de la cellule et l'immunité innée antivirale. A ce titre, les peroxysomes sont la cible de nombreux virus. Lors d'un crible visant à découvrir de nouveaux partenaires cellulaires des complexes de réplication d'HCV, nous avons identifié la protéine ACBD5, une protéine de la membrane des peroxysomes. Des expériences d'immunomarquage ont permis d'observer dans une sous-population de cellules Huh-7 infectées un recrutement partiel d'ACBD5 et d'autres marqueurs peroxysomiaux à proximité des complexes de réplication virale. Par ailleurs, indépendamment de leur recrutement, la morphologie des peroxysomes apparaît modifiée dans 20 à 30% des cellules infectées, selon la souche considérée. En effet, à 16 jours post-infection dans cette sous-population de cellules, le volume moyen des peroxysomes est multiplié par 2,3 tandis que le nombre de peroxysomes est divisé par 2,8. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle des peroxysomes dans le cycle viral. Pour ce faire, nous avons généré par CRISPR-Cas9 des cellules Huh-7 dépourvues de peroxysomes en inactivant le gène PEX3, ainsi que des cellules démunies de peroxysomes fonctionnels en inactivant le gène PEX5. Ces cellules KO ont été infectées avec les souches JFH1 et DBN3a d'HCV. Les particules virales infectieuses sécrétées dans le surnageant des cellules infectées ont été titrées et n'ont révélé aucun impact des KO sur la production de nouveaux virions. Les peroxysomes ne sont donc pas essentiels à l'établissement de l'infection par HCV. Cependant, l'impact du virus sur ces organelles peut participer à sa pathogénèse. Nous avons alors tenté de déterminer l'impact de l'infection sur le métabolisme des peroxysomes. Nous avons mis en évidence une augmentation du stress oxydatif spécifiquement dans les peroxysomes de cellules Huh-7 contenant un réplicon d'HCV, corrélé à une diminution de l'activité de la catalase, l'enzyme principale de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les peroxysomes. La diminution de l'activité de la catalase n'est pas corrélée à une diminution de son expression, ce qui suggère une inhibition de l'enzyme par HCV. Les altérations engendrées par un stress oxydatif chronique peuvent être variées, mais un lien entre défaut de régulation des ROS, vieillissement cellulaire, dommages à l'ADN et apparition de cancer a déjà été établi dans d'autres contextes. L'analyse d'échantillons de patients pourrait nous aider à déterminer les conséquences des altérations causées aux peroxysomes par l'hépatite C chronique.

English abstract

Hepatitis C is a chronic disease causing progressive hepatic damage that can lead after 20 or 30 years to cirrhosis or hepatocarcinoma. The pathogen responsible for this disease is the hepatitis C virus (HCV). It is a small enveloped virus with a single-stranded positive RNA genome that infects human hepatocytes and spreads exclusively by blood contact. HCV induces oxidative stress and hijacks host-cell metabolism, especially lipid metabolism. To do so, it disturbs the morphology and function of several organelles, including endoplasmic reticulum, lipid droplets and mitochondria. Recent studies indicate that peroxisomes may also be impacted by HCV infection. Peroxisomes are small spherical organelles that are highly dynamic and versatile, adapting in number, size and function to the cellular context. They are involved in many metabolic pathways, including lipid metabolism, redox homeostasis and innate antiviral immunity. In this respect, peroxisomes are targeted by many viruses. In a screen aiming at discovering new cellular partners of viral replication complexes, we identified the peroxisomal membrane protein ACBD5. Immunostaining experiments allowed us to observe a partial recruitment of ACBD5 and other peroxisomal markers in the vicinity of HCV replication complexes in a sub-population of infected Huh-7 cells. Furthermore, peroxisome morphology appears to be altered in 20-30% of infected cells (depending on the strain used), irrespective of their recruitment. Indeed, after 16 days of infection, the average volume of peroxisomes is multiplied by 2.3, while their number is divided by 2.8 in this cell sub-population. Then, we investigated the role of peroxisomes in the HCV life cycle. To do so, we generated Huh-7 cells devoid of peroxisomes by inactivating the PEX3 gene, and Huh-7 cells lacking functional peroxisomes by inactivating the PEX5 gene, using CRISPR-Cas9 technology. These KO cells were infected with HCV strains JFH1 and DBN3a. Infectious viral particles secreted by these cells were then titered, revealing no impact on virions production. This indicates that peroxisomes are not crucial for HCV to establish infection. However, the impact of the virus on these organelles may contribute to its pathogenesis. We then sought to determine the impact of infection on peroxisome metabolism. We demonstrated an increase in oxidative stress specifically localized in the peroxisomes of Huh-7 cells containing an HCV replicon, correlated with a decrease of catalase activity, which is the main enzyme involved in peroxisomal reactive oxygen species (ROS) detoxification. The decrease of catalase activity is not accompanied by a decrease of its expression, suggesting the inhibition of this enzyme by HCV. The damages caused by chronic oxidative stress can be diverse, but a link between ROS misregulation, cellular aging, DNA damage and cancer has already been established in other contexts. Analysis of patient samples could help determine the consequences of peroxisomal damages caused by chronic hepatitis C.

Abréviations

A

AAA-ATPase : ATPase associated with diverse cellular activities

AAD : antiviraux à action directe

ABCD1/3 : ATP-binding cassette sub-family D member 1/3

ACBD2/4/5 : acyl-CoA binding domain 2/4/5

ACN : acetonitrile

ACOX1/2 : acyl-CoA oxidase 1/2

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN codant

AGP : 1-*O*-alkyl-G3P

AGPS : 1-alkyl-glycerone-3-phosphate synthase

AGT : alanin glyoxylate aminotransferase

AH : amphipatic helix

ALBI : albumine-bilirubine

AMACR : α -méthylacyl-CoA racemase

AMN : adrénomyélongueuropathie

AP2M1 : adaptor-related protein complex 2 subunit Mu 1

ApoB/E/... : apolipoprotéine B/E/...

APRI : aspartate transaminase to platelets ratio index

ARFP : alternative reading frame protein

ARN : acide ribonucléique

ATF4/6 : activated transcription factor 4/6

ATG5/10 : autophagy related protein 5/10

ATGL : adipose triglyceride lipase

ATM-kinase : ataxia telangiectasia mutated kinase

ATP : adénosine triphosphate

B

BAAT : bile acid-CoA aminoacyl transferase

BCA : bicinchoninic acid

Biotin-Osu : D-Biotin N-hydroxysuccinimide ester

BNX : beige/nude/X-linked immunodeficient

BP : biotin phenol

BSA : bovine serum albumine

C

CA-CoA : cholic acyl-CoA

CARD : caspase activation recruitment domain

CDCA-CoA : chenodeoxycholic acyl-CoA

CHO : chinese hamster ovary cells

CHMP1B/8 : charged multivesicular body protein 1B/8

CLDN 1 : claudine 1

CLEM : correlative light and electron microscopy

CoA : coenzyme A

CoL1A : collagène de type 1A

CRAT : carnitin acyl-transferase

CROT : carnitine octanoyl acyl-transferase

CypA : cyclophiline A

CYP2E1 : cytochrome P450 2E1

D

D1/D2/D3: domain 1/2/3

DAPI : 4 ,6-Diamidino-2-phenylindole

DBP : D-bifunctional protein

DENV : dengue virus

DGAT1 : diacylglycerol acyltransferase 1

DHA : docosahexaenoic acid

DHAP : dihydroxyacetone phosphate
DHC-CoA : dihydroxycholestanic-CoA
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO : diméthylsulfoxyde
DMV : double membrane vesicle
DLP1/DRP1 : dynamin-like protein 1
D-PBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline
Dpi : days post infection
DUB : de-ubiquitinating enzyme

E

E1/E2: envelope protein 1/2
ECI2 : enoyl-CoA delta isomerase 2
ECL : enhanced chemiluminescence detection
EDEM : ER degradation enhancing mannosidase-like protein
EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR : epidermal growth factor receptor
EGTA : ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α
EM: extrahepatic manifestation
EMCV : encephalomyocarditis virus
EqHV : equine hepacivirus
ERAD : ER-associated degradation
ERDppV : ER-derived ppV
ESCRT-III : endosomal sorting complexes required for transport
ESLD : end stage liver disease
EV71 : enterovirus 71

F

FA : fatty acid
FAD/FADH₂ : flavine adenine dinucleotide (respectivement forme oxydée et réduite)

FAS : FA synthase

FAR1/2 : FA-CoA reductase 1/2

FFAT : two phenylalanins in an acidic tract

FIS1 : fission 1 protein

FPP : farnesyl diphosphate

G

G3P : glycerol 3 phosphate

G3PDH : G3P dehydrogenase

GAG : glycosaminoglycan

GFP : green fluorescent protein

GT : génotype

GTP : guanosine triphosphate

H

HACL1 : 2-hydroxyacyl CoA lyase 1

HAV : hepatitis A virus

HBV : hepatitis B virus

HCC : hepatocellular carcinoma

HCD : high-energy collisional dissociation cell

HCMV : human cytomegalovirus

HCV : hepatitis C virus

HCVcc : HCV cell culture

HCVpp : HCV pseudoparticle

HIV : human immunodeficiency virus

HMG-CoA : hydroxyméthylglutaryl-CoA

Hpi : hours post infection

HPLC : high-performance liquid chromatography

HRP : horseradish peroxidase

HSPG : heparan sulfate proteoglycan

HSV-1 : herpes simplex virus 1

hVPS35 : human vacuolar protein sorting ortholog 35

HVR1 : hypervariable region 1

I

IAV : influenza A virus

IFN : interféron

IL-6 : interleukine 6

IMC : indice de masse corporelle

IPP : isopentyl diphosphate

IRE α : inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease α

IRES: internal ribosome entry site

IRF : interferon regulatory factor

IRGM : immunity-related GTP-ase family M protein

IRM : imagerie par résonance magnétique

IRS : insuline receptor substrate

ISG : IFN-stimulated gene

J

JFH1 : Japanese fulminant hepatitis clone 1

K

kDa: kilo-Dalton

KO : knock-out

KSHV : Kaposi sarcoma-associated herpesvirus

L

La : la autoantigen

LC : liquid chromatography

LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LD: lipid droplet

LDH : lactate dehydrogenase

LDL : low density lipoprotein

LDL-R : LDL receptor

LPA : lysophosphatidic acid

15-LOX : 15-lipo-oxygenase

LVP : lipoviroparticule

M

mAb : monoclonal antibody

MAM : mitochondrial-associated ER membrane

MAVS : mitochondrial anti-viral signaling protein

MBN : mung bean nuclease

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MCS : membrane contact site

MDA-5 : melanoma differentiation-associated protein 5

MDppV : mitochondria-derived ppV

MET : microscopie électronique à transmission

MFF : mitochondrial fission factor

MHV : murine hepatitis virus

MIRO1 : mitochondrial rho-GTPase 1

MIT : microtubule interacting and trafficking

MMP3 : matrix metalloproteinase-3

MMV : multiple membrane vesicle

MOI : multiplicity of infection

mPST1 : membrane peroxisome targeting signal class 1

MS : mass spectrometry

MSM : men having sex with men

MSP : major sperm protein

MTP : mitochondrial trifunctional protein

MTTP : microsomal triglyceride transfer protein

N

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (forme réduite)

NBR1 : neighbor of BRCA1 gene 1 protein

NEFA : non-esterified FA

NFκB : nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells

NI : nucleos(t)idic inhibitor

NNI : non-nucleos(t)idic inhibitor

NOX1/4 : NADPH oxidase 1/4

NPHV : non-primate hepacivirus

NS2/3/4/5: non structural protein 2/3/4/5

O

OCLN : occludine

OMS : organisation mondiale de la santé

OptiMEM : milieu essentiel minimal

ORF : open reading frame

P

PCC : Pearson's correlation coefficient

PCR : polymerase chain reaction

PDCoV : porcine deltacoronavirus

PEDV : porcine epidemic diarrhea virus

PERK : PRK-like endoplasmic reticulum kinase

PEX... : peroxin... protein

PFA : paraformaldéhyde

PHYH : phytanoyl CoA 2-hydroxylase

PI : protease inhibitor

PI4KIIIα : PI4 kinase III α

PI4P : phosphatidyl inositol 4-phosphate

PI(4,5)P₂ : phosphatidyl inositol diphosphate

PLS-DA : partial least squares – discriminant approach

PMP : peroxisomal membrane protein

Ppm : parties par million

PPM1G : protein phosphatase member 1G

ppV : pre-peroxisomal vesicle

PrEP : pre-exposure prophylaxis

PRK : phosphoribulokinase

PTB : polypyrimidine tract binding protein

PUFA : poly unsaturated fatty acid

PWID : people who inject drugs

R

RdRp : RNA-dependant RNA polymerase

RE : réticulum endoplasmique

RHV : rodent hepacivirus

RHV-rn1 ! RHV from *Rattus norvegicus* species 1

RIG-I : retinoid acid-inducible gene I

RLR : RIG-I like receptor

RLuc : Renilla luciferase

RO : replication organelle

ROI : region of interest

ROS : reactive oxygen species

Rpm : rotations par minute

Rubicon : run domain Beclin-1 interacting and cystein-rich domain-containing protein

S

SARS-CoV2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SCID : severe combined immunodeficient

SCPx : sterol carrier protein X

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM : standard error of the means
SGR : subgenomic replicon
SMV : single membrane vesicle
SP : signal peptidase
SPCS : signal peptidase complex subunit 1
SPP : signal peptide peptidase
SR : super-résolution
SR-B1 : scavenger receptor B1
SREBP : sterol regulatory element binding protein
STAT1 : signal transducer and activator of transcription 1
SVR : sustained virologic response
SVR12 : SVR at week 12
Syt1/2/3/7 : synaptotagmin 1/2/3/7

T

TAN : test d'amplification des acides nucléiques
TCID50 : median tissue culture infectious dose (50%)
TGFβ1 : transforming growth factor β1
TGN : trans-golgi network
THA : tetracosahexaenoic acid
THC-CoA : trihydroxycholestanic-CoA
Timp1 : TIMP metallopeptidase inhibitor 1
TIR : toll/interleukine 1 receptor
TNFα : tumor necrosis factor α
B-TRCP : β-transducin repeat containing protein
TRIF : TIR domain containing adaptor protein inducing IFN-β

U

UPR : unfolded protein response
UTR : untranslated region

UVRAG : ultraviolet radiation resistance-associated gene protein

V

VAP-A/B : VAMP-associated protein A/B

VAPB-MSP : VAP-B membrane scaffold protein

VAMP : vesicle-associated membrane protein

VLCFA : very long chain fatty acid

VLDL : very low density lipoprotein

VLDL-R : VLDL receptor

vMIA : viral mitochondrial inhibitor of apoptosis

W

Wnt : wingless-related integration site

WNV : west nile virus

X

X-ALD : X-linked adrenoleukodystrophy

XBP1 : X-box binding protein 1

Z

ZIKV : zika virus

ZSD : Zellweger spectrum disease

Introduction

I-L'Hépatite C

A- Description de la maladie

1) 1970 : une nouvelle hépatite ?

Dans les années 1970, de nombreux cas d'hépatite post-transfusionnelle se sont déclarés. On connaissait alors deux agents potentiellement responsables, l'hépatite A et l'hépatite B. Cependant, certains patients, présentant bien une hépatite, se révélaient négatifs aux tests sérologiques HAV/HBV (virus de l'hépatite A/B). Un autre type d'hépatite, décrite pendant quinze ans comme l'hépatite « non-A non-B » et responsable de plus de 75% des hépatites post-transfusionnelles, avait été identifié sans qu'on en connaisse la cause (1). En 1978, on acquit la certitude que l'hépatite « non-A non-B » était due à un agent transmissible en inoculant le sérum de patients atteints à des chimpanzés, qui contractaient eux-mêmes une hépatite après 13 semaines d'incubation (2). S'en suivit une traque du ou des agents pathogènes, qui aboutit en 1989 à l'identification du virus de l'hépatite C (HCV) par l'équipe de Michael Houghton, qui parvint par des techniques de biologie moléculaire à isoler un unique clone d'ADN complémentaire viral (3).

2) Epidémiologie de l'hépatite C

Une fois l'agent pathogène découvert, les premiers tests sérologiques ont permis de prendre conscience de l'ampleur de l'épidémie. Il s'est avéré que la prévalence d'HCV dans la population générale avait été très sous-estimée, de nombreux pays découvraient que 1 à 5% de leur population totale était chroniquement infectée. On estimait en 2004 que 3% de la population mondiale, soit 170 millions

d'individus, étaient porteurs du virus (4). Aujourd'hui, environ 58 millions de personnes dans le monde présentent encore une hépatite C chronique et 290 000 personnes décèdent chaque année des suites de la maladie, principalement de cirrhose ou d'hépatocarcinome (cancer primitif du foie). Bien que le monde entier soit concerné par la maladie (figure 1), on observe certaines zones géographiques particulièrement touchées, comme l'Égypte, où la séroprévalence variait en 2015 de 0,8% à 27,8% selon le sexe et la classe d'âge considérée (5). On estime qu'en France 0,3% de la population serait infectée, soit environ 200 000 individus, ce qui fait de notre pays un territoire à faible endémie.

Dans certains pays où la lutte contre HCV était insuffisante, le virus s'est répandu dans la population générale. Au contraire, dans les pays industrialisés, on remarque une concentration de la maladie au sein de sous-populations marginalisées, notamment les personnes consommant des drogues injectables (PWID : People Who Inject Drugs) (6). Aujourd'hui, on considère que 23% des nouveaux cas d'hépatite C et 33% des décès imputés au virus sont liés à la consommation de drogues injectables.

Le virus de l'hépatite C a fait l'objet d'une pandémie « surprise » notamment à cause du délai de 20 à 30 ans entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes. Le dépistage est donc un enjeu primordial dans la lutte contre la maladie, mais les populations à risque (populations de pays en voie de développement, travailleurs du sexe, populations vivant en milieu carcéral, personnes consommant des drogues injectables) y ont difficilement accès. Les campagnes internationales de dépistage organisées par l'OMS sont encore trop peu efficaces ; on estime qu'encore 79% des porteurs d'HCV (soit 46 millions d'individus) ignorent leur statut sérologique en 2023.

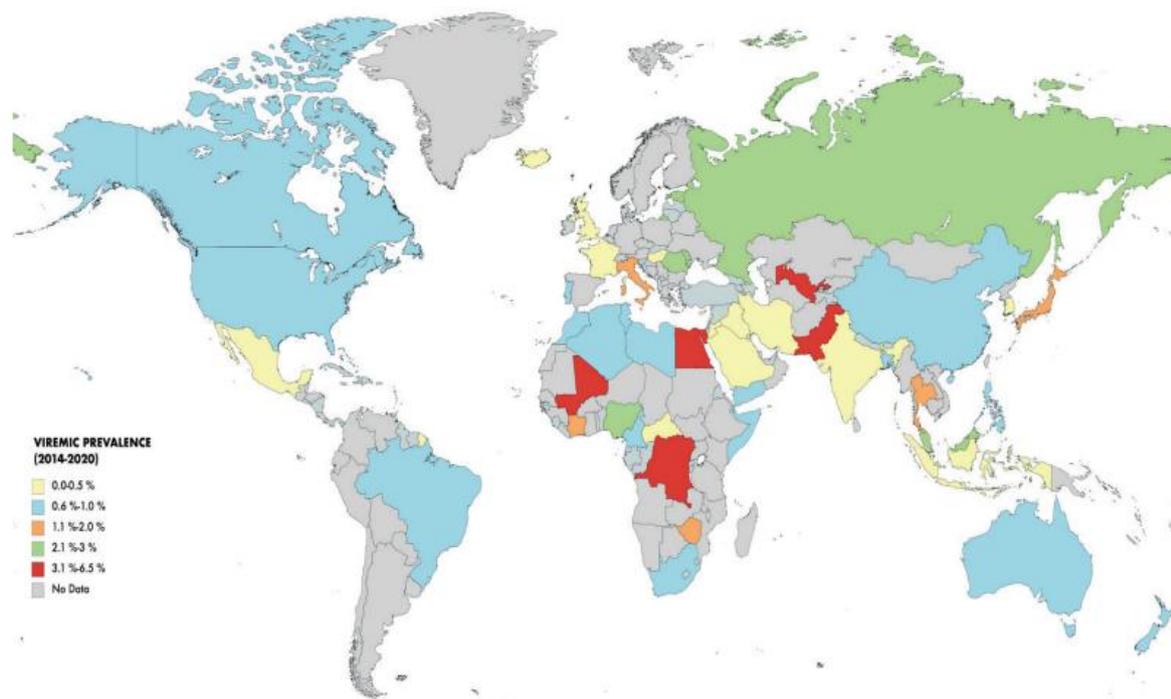


Figure 1 : prévalence de l'hépatite C dans le monde (tiré de (7)).

Selon une estimation de l'OMS, on compterait chaque année 1,5 millions de personnes nouvellement infectées par HCV dans le monde. Cependant, depuis 2014 et la mise sur le marché d'antiviraux à action directe, l'optimisme est de rigueur. Les autorités internationales de santé ont ainsi pour objectif une diminution de 90% des néo-infections et de 65% des décès associés à l'hépatite C d'ici à 2030, grâce à des campagnes massives de prévention, de dépistage et de traitement des malades (8).

3) Transmission de la maladie

Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmis par voie sanguine. La propagation de HCV avant sa découverte est imputée à de mauvaises pratiques sanitaires, que ce soit via des transfusions de sang contaminé ou l'utilisation de matériel médical mal stérilisé, conduisant à une transmission iatrogène de la maladie. Par exemple, HCV s'est propagé en Egypte lors de campagnes nationales de traitement contre la schistosomiase dans les années 60-70-80. Les mauvaises pratiques sanitaires lors de ces campagnes font de l'Egypte le pays avec la plus forte

prévalence au monde (soit 4% de la population globale et 22,1% des 55-59 ans) (9). Ce mode de transmission est aujourd'hui marginal dans les pays industrialisés, mais encore présent dans les pays en voie de développement. La transmission du virus par le sang cause également sa prévalence augmentée dans les populations consommatrices de drogues injectables (non-stérilité du matériel de shoot, partage des seringues et aiguilles, marginalisation entraînant un mauvais accès aux soins...).

La transmission d'HCV lors de rapports sexuels a longtemps fait débat. En 2013, une étude américaine a suivi 500 couples hétérosexuels monogames dont un des deux partenaires était HCV-positif et a conclu à un taux de transmission d'HCV lors de relations sexuelles de 0.07% par an, soit approximativement lors d'un rapport sexuel sur 190 000. Aucune pratique sexuelle favorisant la transmission n'a pu être identifiée, mais le contact de muqueuses avec du sang de patient infecté ou un fluide corporel dérivé de sérum d'un patient infecté serait une voie de transmission probable. La transmission d'HCV lors de rapports sexuels reste éminemment moins efficace que la transmission d'autres virus comme HBV ou HIV (virus de l'immunodéficience humaine) (10). Mais récemment, le débat de la transmission sexuelle d'HCV a été relancé par plusieurs études portant sur les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (MSM, pour *men having sex with men*). En effet, depuis 2007, plusieurs études pointaient du doigt une prévalence plus importante d'HCV dans ces populations, d'abord parmi les MSM HIV-positifs, puis parmi les MSM HIV-négatifs éligibles ou sous traitement prophylactique (PrEP). Il a été mis en évidence que l'incidence d'HCV dans les populations MSM HIV-positives était passée de 0,07% en 1990 à 1,8% en 2014, de 0,07% à 0,04-0,15% pour les populations MSM HIV-négatives. Bien qu'il soit difficile d'établir avec certitude quel comportement sexuel serait susceptible de transmettre le virus plus efficacement, il semblerait que les pratiques sexuelles à haut risque (rapports sexuels non protégés, partage de sextoys, chemsex, relation multipartenaires) conduisent plus fréquemment à la transmission de la maladie. Enfin, la co-infection avec des infections sexuellement transmissibles (IST), un taux de lymphocytes CD4 bas et une grande charge virale chez les patients HIV-positifs apparaissent également comme des facteurs majeurs de risque (11).

La transmission verticale de la mère à l'enfant lors des deuxième et troisième trimestres de grossesse a également été observée. L'enfant né de mère HCV-positive sera lui aussi HCV-positif dans 5,8% des cas, 10,8% si la mère est co-infectée par

HCV et HIV (12–14). La transmission se faisant pendant la grossesse, la naissance par césarienne est inefficace pour lutter contre HCV et n'est pas particulièrement indiquée pour les mères HCV-positives (14).

4) Pathogenèse

L'hépatite C est une maladie évolutive. Elle se caractérise par une forme aiguë, majoritairement asymptomatique et persistant dans 55 à 85% des cas sous une forme chronique. Dans de très rares cas, l'infection peut se traduire par une hépatite fulminante et devient alors une urgence médicale absolue. La transition de la forme aiguë à chronique passe généralement inaperçue car elle est souvent asymptomatique. Parmi cette proportion de malades chroniques, 20 à 30% contractent une cirrhose sur une période de 20-30 ans après l'infection. L'hépatite C peut à terme causer un hépatocarcinome (HCC), dont la probabilité d'apparition augmente au cours du temps (Figure 1) (15).

a) *Forme aiguë*

La forme aiguë de l'infection est asymptomatique dans 80% des cas. Pour les 20% restants, les symptômes sont ceux d'une atteinte au foie non-caractéristique : fatigue, fièvre, perte de l'appétit, nausées, douleurs abdominales, ictère. Chez la plupart des malades, de l'ARN viral est détectable au bout de 7 jours post-infection, tandis que des anticorps anti-HCV sont détectés dans le serum des patients à partir de 12 semaines post-infection. Pour 15 à 25% des patients, une forte réponse immunitaire élimine naturellement le virus, ce taux de guérison spontanée pouvant monter à 45% lorsque la phase aiguë est symptomatique ou que le patient est un enfant ou une jeune femme (15). L'infection par HCV n'est pas immunisante, il existe donc un risque de réinfection post-guérison (16). Lorsque le virus n'est pas rapidement éliminé, l'hépatite C devient chronique.

b) Forme chronique

L'évolution vers une forme chronique de l'hépatite C advient dans 55 à 85% des cas. Elle est définie par la persistance d'ARN viral 6 mois après l'infection initiale. Une fois l'infection installée, les guérisons spontanées sont rarissimes. Lors de la phase chronique, une relative tolérance du système immunitaire s'installe et conduit au maintien d'un titre viral modéré. Le basculement vers une forme chronique dépend donc en partie du statut immunitaire de l'individu au moment de l'infection. Un nouveau-né, une femme enceinte ou une personne immunodéprimée auront une plus forte probabilité de voir la maladie évoluer vers une forme chronique qu'un individu jeune avec un système immunitaire alerte et performant.

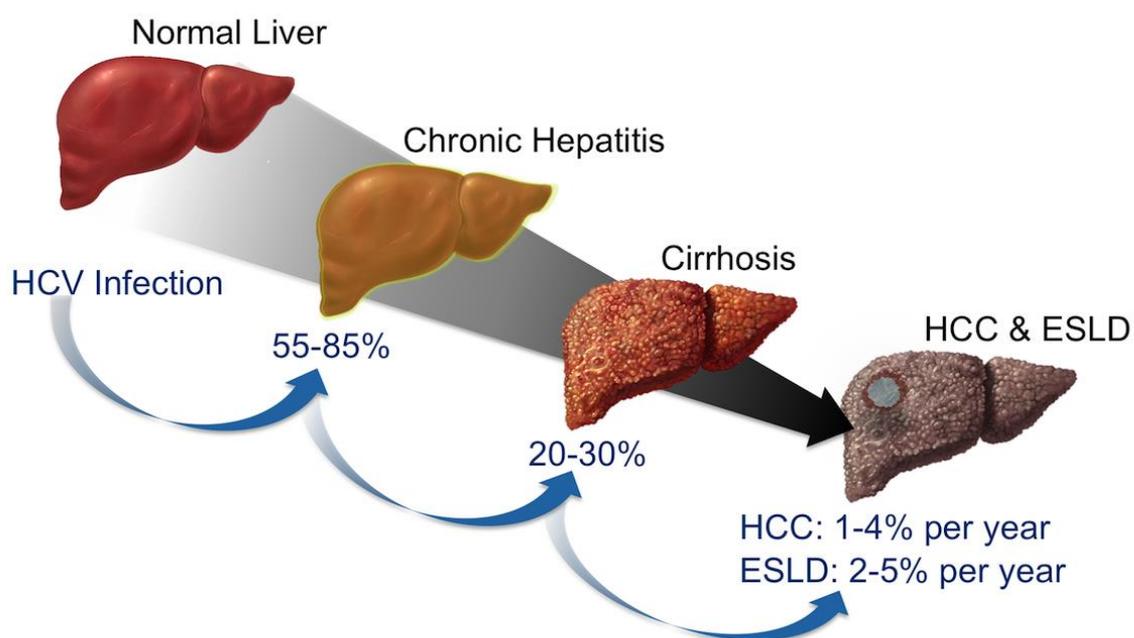


Figure 2 : évolution des atteintes hépatiques causées par l'hépatite C (tiré de (15)). HCC : hepatocarcinoma ; ESLD : end stage liver disease.

L'évolution de la maladie est lente en l'absence de facteurs de co-morbidité, il est fréquent qu'aucun symptôme ne soit détecté pendant plus de 20 ans. On voit apparaître et progresser peu à peu une fibrose hépatique, liée à un contexte nécrotico-inflammatoire chronique. Le virus en lui-même est peu ou pas hépatotoxique, la majorité des lésions hépatiques résultant de l'infection sont en fait dues à la réponse immunitaire qui vise et détruit les cellules infectées, sans parvenir à éliminer totalement

l'agent pathogène (17). La progression de la maladie est décrite par différents « stades » caractérisant l'état global du foie, en se référant à l'importance des lésions irréversibles et au degré d'avancement de la fibrose. On parle de stade aigu ou chronique, précoce ou tardif, cirrhotique ou non-cirrhotique, compensé ou décompensé, et enfin terminal (18). La vitesse de progression de la fibrose hépatique dépend significativement de l'hôte et de facteurs environnementaux. En effet, le risque d'une évolution plus rapide est associé à différents critères incluant l'âge, le sexe du patient (un individu masculin a plus de risque de voir la maladie évoluer rapidement qu'un individu féminin), la consommation d'alcool, l'obésité, l'insulino-résistance, le diabète de type 2, la prise d'un traitement immunosuppresseur ou encore une co-infection par HBV ou HIV. Il existe également des facteurs génétiques, de l'hôte et de l'agent pathogène, influençant la progression de la fibrose. Les stades finaux de la maladie sont le développement d'une cirrhose hépatique, que 20 à 30% des malades développent sur une période de 30 ans post-infection, accompagnée parfois d'une stéatose hépatique, et d'un carcinome hépatocellulaire, qui une fois la cirrhose installée présente chaque année 2 à 6% de risque de se développer. (16) L'apparition d'une stéatose hépatique dépend, comme la fibrose, de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, mais également du génotype d'HCV avec lequel les patients sont infectés. En effet, le génotype 3 cause plus fréquemment l'apparition de stéatose hépatique, de cirrhose et d'hépatocarcinome que les autres génotypes (19,20).

c) Manifestations extrahépatiques

L'hépatite C chronique peut engendrer de nombreuses manifestations extra-hépatiques (EMs), liées directement ou indirectement à l'infection virale. On estime que 74% des patients chroniquement infectés connaîtront au moins une EM (17).

Il existe une classification des EMs qui les répartit en sept classes : manifestations générales, organe-spécifiques, autoimmunes, neuropsychiatriques, métaboliques, cardiovasculaires ou néoplasiques (Figure 3). Plusieurs EMs ont une caractéristique auto-immune comme la cryoglobulinémie, l'EM la plus courante, ou l'arthrite rhumatoïde. Deux études ont conclu que 36 à 54% des patients HCV-positifs présentaient une forme détectable de cryoglobulinémie, et que 25% en comportaient des signes cliniques (21,22). Les symptômes les plus courants de la cryoglobulinémie

sont une vascularite cutanée avec présence de purpura (18-33% des cas), des douleurs s'apparentant à une arthralgie et/ou une myalgie (35-54%), une neuropathie (11-30%) et des complications rénales, comme la glomérulonéphrite (27%).

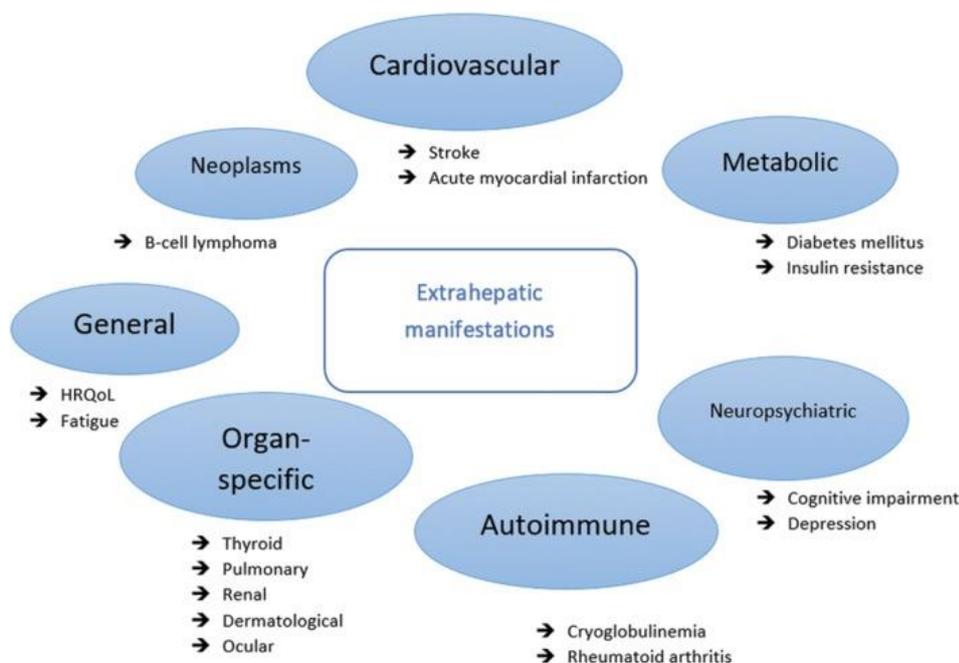


Figure 3 : manifestations extra-hépatiques (tiré de (17)).

d) Hépatite C et comorbidités associées

De par son mode de transmission, l'infection par le virus de l'hépatite C peut être associée à d'autres infections à transmission hématogène, notamment HIV et HBV.

Co-infection HCV-HIV

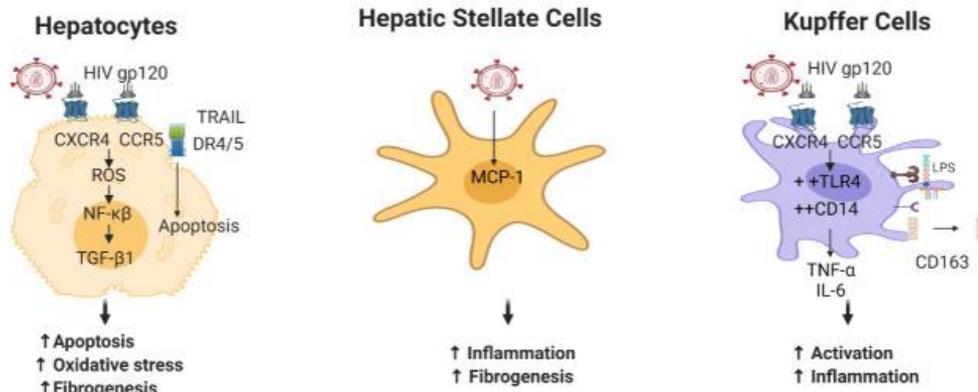
On estime qu'un patient HIV-positif a six fois plus de risques d'être HCV-positif qu'une personne HIV-négative. La co-infection HIV-HCV cause une augmentation des risques de passage du stade aigu au stade chronique, une virémie plus importante et une progression plus rapide des symptômes hépatiques. Cette accélération de la progression des atteintes hépatiques a été constatée même lorsque l'infection par HIV était associée à la prise d'antirétroviraux (23).

Il a été démontré par plusieurs études que l'infection par HIV favorisait une progression plus rapide des atteintes hépatiques dues à HCV, que ce soit une évolution accélérée des fibroses hépatiques (24,25) ou l'aggravation des derniers stades de la maladie (26). Cependant, cela ne se vérifie pas dans les études plus récentes (19). Cela pourrait s'expliquer par l'amélioration des traitements anti-HIV, qui seraient moins hépatotoxiques, et un meilleur contrôle de la virémie HIV chez les patients co-infectés (27).

La co-infection HIV-HCV a des impacts directs et indirects sur la progression des symptômes hépatiques en comparaison avec une mono-infection par HCV (Figure 4). HIV favorise directement la progression de la fibrose hépatique par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de la voie NFκB. Il induit également l'expression de gènes fibrogènes comme Col1A et Timp1 et inhibe l'expression de MMP3, potentiellement anti-fibrogène (28). Par ailleurs, l'infection des cellules stellaires et de Kupffer par HIV participe à amplifier le contexte inflammatoire chronique déjà engendré par HCV. HIV induit dans les cellules stellaires l'expression de collagène I fibrogène et la sécrétion de MCP-1, une cytokine pro-inflammatoire (29), ainsi que de TNF-α et d'IL-6, deux cytokines pro-inflammatoires, dans les cellules de Kupffer. (30)

La co-infection HIV-HCV impacte également les taux de transmission verticale et sexuelle d'HCV. Les risques de transmission verticale augmentent de 5.8% (mono-infection HCV) à 10.8% (co-infection HIV-HCV) (14).

A Direct Effects



B Indirect Effects

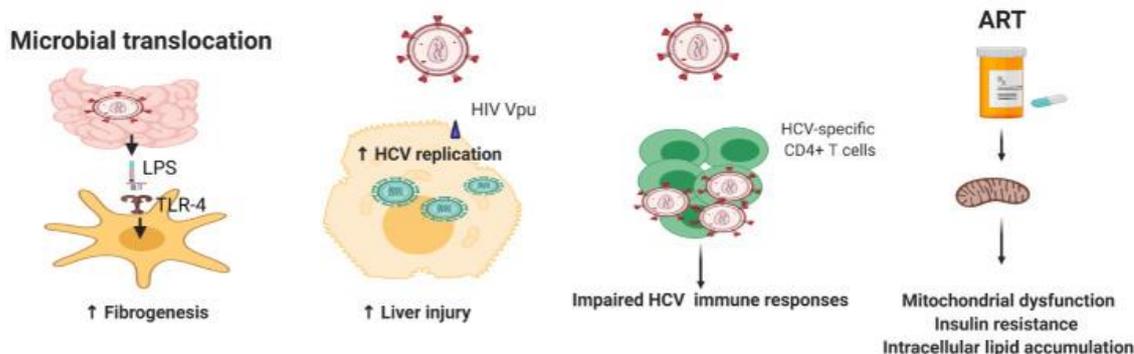


Figure 4 : impact d'HIV sur la progression des symptômes hépatiques lors d'une co-infection HIV-HCV (tiré de (23)). (A) Effets directs sur les hépatocytes, les cellules stellaires et les cellules de Kupffer. (B) Effets indirects.

Co-infection HCV-HBV

HCV et HBV ont le même tropisme, ils infectent tous deux les hépatocytes humains. Lorsque deux virus infectent les mêmes cellules, on observe généralement la « dominance » d'un virus sur l'autre, soit l'inhibition ou la suppression de la réplication du virus dominé au profit du virus dominant (31). Dans le cas d'une co-infection HCV-HBV, il a été démontré une inhibition mutuelle de la réplication des deux virus, mais c'est généralement la réplication d'HCV qui prend le pas sur celle d'HBV (47% des cas, contre 14% de cas HBV-dominant et 18% de co-dominance) (32). Dans ce cas, l'infection par HBV peut être totalement occultée. On ne retrouve alors pas d'ADN d'HBV dans le sérum des patients, parfois même aucun anticorps anti-HBV n'est détecté, ce qui peut fausser le dépistage (33). En conséquence, la prédiction de la fréquence de co-infections HCV-HBV est difficile ; on estime cependant qu'aux Etats-Unis, environ 10 à 15% des patients HCV-positifs sont également HBV-positifs (34). Le mécanisme causant l'inhibition de la réplication d'HBV par HCV n'a pas encore été clairement identifié.

La co-infection HCV-HBV cause des taux plus importants de cirrhose (44% contre 21%) et de décompensation (24% contre 6%) en comparaison avec les patients mono-infectés (35). Par ailleurs, le risque de développer un hépatocarcinome est également augmenté. Une étude de Chiaramonte *et al.* démontre que chez les patients cirrhotiques compensés, le risque de développer un hépatocarcinome passe de 2% par an en mono-infection HBV et 3,7% par an en mono-infection HCV à 6,4% par an en cas de co-infection (36).

Consommation d'alcool

La consommation abusive d'alcool est connue pour causer une fibrose et une cirrhose hépatique. HCV causant les mêmes symptômes, il est assez intuitif d'imaginer que la consommation régulière d'alcool est un facteur aggravant de l'hépatite C. En effet, la prise journalière de 50g d'alcool est associée à une augmentation de 34% de la progression de la fibrose en comparaison avec une consommation nulle. Par ailleurs, une consommation de 30g d'alcool par jour est associée à une augmentation du risque de cirrhose de 22% (32% contre 10% parmi les patients ne buvant pas d'alcool) (37). Même une consommation modérée d'alcool a un impact négatif sur l'évolution de la maladie (38). Il a été prouvé que la consommation ponctuelle d'alcool favorise la réplication d'HCV à court terme en interférant avec la signalisation de l'interféron, ce qui a pour conséquence de diminuer l'efficacité de la réponse immunitaire innée. Par ailleurs, une consommation régulière d'alcool est associée à une augmentation du stress oxydatif via la production de ROS, ce qui favorise la progression des symptômes hépatiques (39).

Obésité et diabète de type II

Il existe une corrélation entre infection par HCV et diabète. En effet, l'infection par HCV semble favoriser l'insulinorésistance (IR) mais de manière réversible. D'après une étude de Butt *et al.*, l'incidence des cas de diabète par an pour mille patients est de 20,6 pour les patients HCV+ non-traités, 19,8 pour les patients traités par administration d'interféron et de ribavirine et 9,89 pour les patients traités avec des antiviraux à action directe (DAA, Direct Acting Antivirals). La diminution du risque d'apparition de diabète de type II est également corrélée avec l'efficacité du

traitement : le gain est meilleur chez les patients dont la virémie reste indétectable après l'arrêt du traitement (SVR pour Sustained Virologic Response). Ces résultats sont encore plus importants pour les patients atteints de fibrose avancée (40).

HCV inhibe à plusieurs niveaux la voie de signalisation de l'insuline dans le foie. Par ailleurs, la réponse inflammatoire chronique secondaire à l'infection (notamment la sécrétion importante de TNF- α et d'IL6) semble induire l'insulinorésistance et le diabète de type II. L'apparition de ces troubles métaboliques semble associée en particulier aux génotypes 1 et 4 (41) et serait causée par la diminution de l'expression d'IRS1/2 (Insuline Receptor Substrate 1/2), deux protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline (42). Cependant, les mécanismes exacts d'apparition de diabète de type II HCV-induit ne sont pas encore bien connus (43).

Plusieurs études pointent la corrélation entre l'indice de masse corporelle (IMC) et un stade plus avancé de fibrose (44). En outre, l'obésité et le diabète sont, tout comme l'infection par HCV, des facteurs de risques de l'apparition d'HCC (45). Ainsi, l'association de facteurs métaboliques favorisant l'apparition d'HCC avec une hépatite C chronique augmente d'autant plus le risque d'apparition d'HCC (43).

B- Le virus de l'hépatite C

1) Description de l'agent pathogène

a) *Phylogénie et classification d'HCV*

Le virus de l'hépatite C appartient au genre *Hepacivirus*, inclus dans la famille des *Flaviviridae* (46) (Figure 5). Il présente une grande variabilité génétique, que l'analyse phylogénique classe jusqu'à aujourd'hui en 8 génotypes et 57 sous-type (7), séparés les uns des autres par au minimum 15% de séquences nucléotidiques divergentes (47). Les deux génotypes les plus répandus dans le monde sont les génotypes 1 et 3, respectivement responsables de 46% et 30% des infections par HCV dans le monde. Les génotypes 2, 4, 5 et 6 sont respectivement présents dans 9%, 8%, 1% et 6% des cas (48), tandis que les génotypes 7 et 8 ont seulement été identifiés respectivement chez quelques patients centre-africains (49) et indiens (50). Cependant, les différents génotypes et sous-génotypes d'HCV sont distribués de manière hétérogène dans le monde, ce qui implique probablement un biais de sur-représentation des génotypes majoritaires dans les pays développés, en lien avec un meilleur dépistage de la maladie. Les génotypes 1a, 1b, 2a et 2b sont majoritaires en Europe et en Amérique, tandis qu'en Inde et au Pakistan le génotype majoritaire est le génotype 3 (Figure 6).

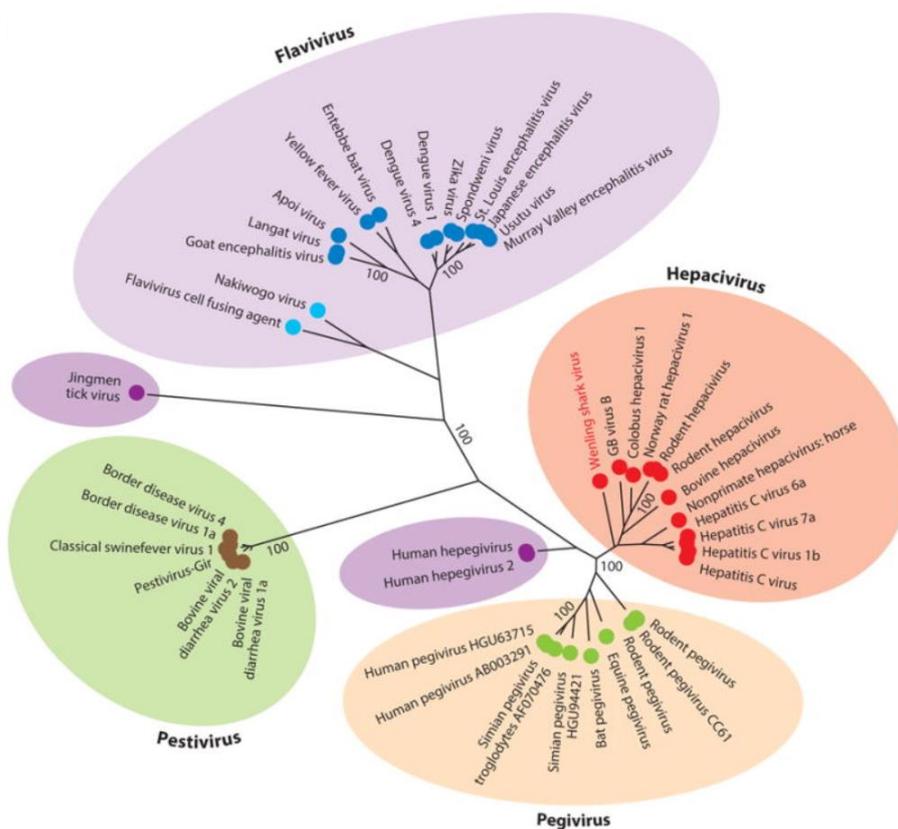


Figure 5 : arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae* (tiré de (51)), basé sur l'analyse du gène hélicase. L'éloignement de chaque branche est proportionnel au pourcentage de divergence entre les séquences.

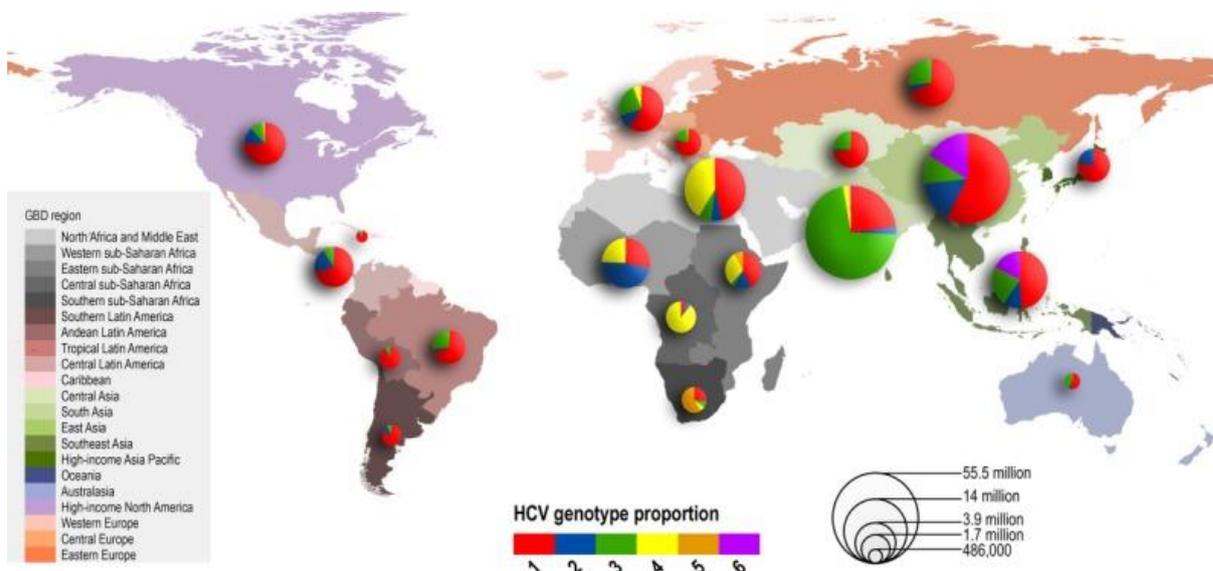


Figure 6 : répartition géographique des différents génotypes d'HCV (tiré de (52)). La taille des diagrammes circulaires est proportionnelle à la séroprévalence d'HCV dans la région correspondante.

b) Le génome d'HCV

Le génome du virus de l'hépatite C est un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9,6kb. Il dispose d'un unique cadre de lecture (Open Reading Frame, ORF), traduit en une unique polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. La séquence codante d'HCV est entourée aux extrémités 5' et 3' de deux régions non-codantes (Untranslated Regions, UTR) possédant des structures secondaires et tertiaires très conservées d'un génotype à l'autre car essentielles à la traduction et la réplication du génome viral. C'est notamment dans la région 5' UTR du génome que se trouve le site interne d'entrée du ribosome (IRES pour *internal ribosome entry site*), site indispensable à la fixation du ribosome sur l'ARN viral et donc à l'initiation de la traduction. L'IRES couvre une séquence de 340 nucléotides, comprenant la majorité de l'UTR 5' et les 40 premiers nucléotides de la séquence codant la protéine virale core (53,54). Une fois traduite, la polyprotéine précurseur est clivée par des protéases cellulaires et virales en 10 protéines fonctionnelles : trois protéines structurales et sept protéines non-structurales (Figure 7).

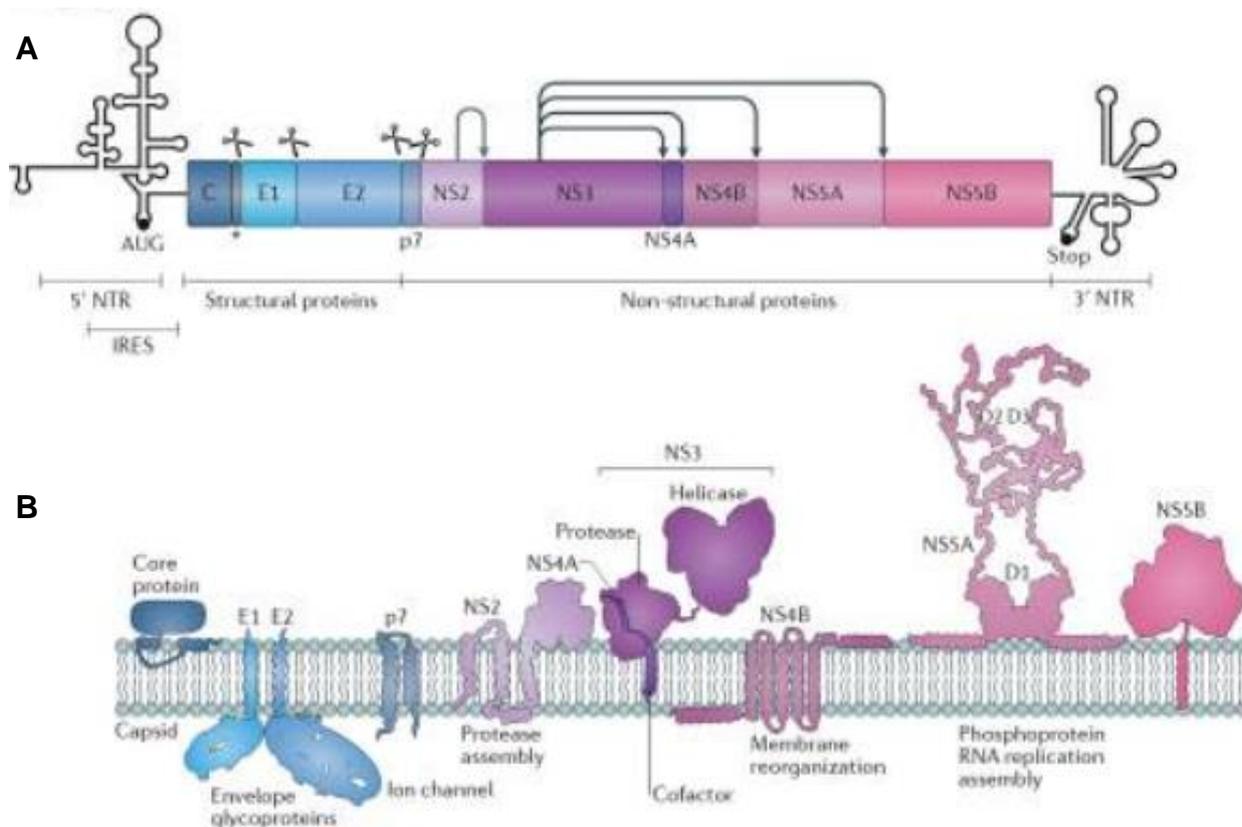


Figure 7 : structure du génome du virus de l'hépatite C (A) et des protéines correspondantes (B) (tiré de (55)). Les sites de clivage par des protéases cellulaires sont représentés par des ciseaux pour la SP (signal peptidase) et une étoile pour la SPP (signal peptide peptidase) tandis que les sites de clivage par les protéases virales sont représentés par des flèches partant de la protéase correspondante.

c) Protéines structurales

Protéine de capsid core

Core est la protéine structurale la plus conservée d'un génotype d'HCV à l'autre. C'est elle qui, lors de l'assemblage des virions, forme la capsid et entoure l'ARN génomique viral. Première protéine virale à être traduite, elle subit deux clivages lors de sa maturation. Dans un premier temps, core est adressée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) alors qu'elle est encore associée à la polyprotéine. Un premier clivage par la SP (signal peptidase) libère core de la polyprotéine en une forme immature de 23 kDa (56). La protéine de capsid est alors clivée une seconde fois par la SPP (signal peptide peptidase), ce qui aboutit à la forme mature et fonctionnelle de core, dont la masse moléculaire est de 21 kDa (57).

La protéine de capsid d'HCV est composée de trois domaines : D1, D2 et D3 (Figure 8). D1 est un domaine hydrophile situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, c'est ce domaine qui interagit avec l'ARN viral et permet son encapsidation lors de l'assemblage des nouveaux virions. D1 interagit également avec la protéine d'enveloppe E1 et de nombreux facteurs cellulaires (58). Le domaine D2 est un domaine hydrophobe nécessaire à la stabilité et à la structure du domaine D1 (59). Il permet également l'association de la capsid virale avec le RE et avec les gouttelettes lipidiques (60), interaction essentielle pour l'assemblage des particules virales. Enfin, D3 est un petit domaine situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il constitue le peptide-signal de la protéine E1 qui permet également l'adressage de core au RE et se retrouve clivé lors de sa maturation (61). Cette protéine forme des homodimères stabilisés par la formation de ponts disulfure intermoléculaire (62).

Core est une protéine multifonctionnelle essentielle à l'étape d'assemblage, elle est également prépondérante dans la pathogenèse associée à l'infection. Le rôle de core étant central dans le cycle cellulaire d'HCV, elle interagit avec l'ARN viral lors de son encapsidation, ainsi qu'avec plusieurs protéines virales et cellulaires, notamment des protéines du RE et des gouttelettes lipidiques (LDs) (63). Core est une source importante de la pathogenèse inhérente à HCV, elle induit un stress du RE et la réponse UPR (Unfolded Protein Response) (64), perturbe le métabolisme des lipides, augmente la production de ROS dans les mitochondries, perturbe le système immunitaire en empêchant la différenciation des cellules dendritiques, favorise la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires, dérégule l'apoptose dans les cellules hépatiques et favorise l'apparition d'HCC (65).

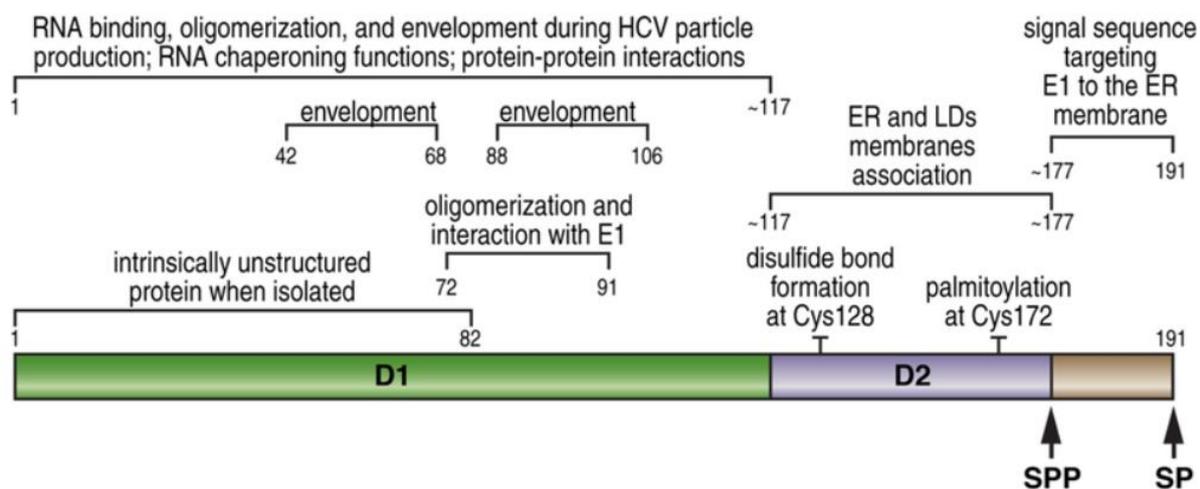


Figure 8 : structure de la protéine core (tiré de (58)). Les sites de clivage sont représentés par des flèches.

Protéine ARFP ou core +1

Il existe un cadre de lecture alternatif dans la région codante de core qui permet la synthèse d'une petite protéine de 16 kDa. Cette protéine est appelée ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*) ou core +1, en référence au changement de cadre de lecture, et est présente sous deux isoformes : Core+1/S (initiation au codon 86-88) et Core+1/L (initiation au codon 26) (66). ARFP est une protéine accessoire qui n'est pas indispensable pour le cycle viral, mais il a été démontré qu'elle était impliquée dans la modulation de l'immunité innée et dans la pathogenèse. En effet, ARFP favorise la progression des atteintes hépatiques et l'apparition de cancer du foie (67,68).

Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (respectivement 29 et 68 kDa) sont séparées de la polyprotéine virale par clivage via des signal peptidases cellulaires. Ce sont des protéines transmembranaires de type I, présentant un domaine transmembranaire à leur extrémité C-terminale. En plus de son domaine transmembranaire, E2 est composée d'un long ectodomaine divisé en trois sous-domaines, une « tête », une « base » et une « tige », tandis que E1 comporte un ectodomaine divisé en deux sous-domaines, un « noyau/cœur » et une « tige ». Les deux protéines d'enveloppe interagissent par l'intermédiaire de leurs ectodomaines

respectifs, celui de E1 s'enroulant autour de la « tige » de E2 (69). E1 et E2 comportent de nombreux sites de N-glycosylation (Figure 9) (70) fortement conservés malgré la grande variabilité génétique d'HCV (71). Les domaines transmembranaires d'E1 et E2 permettent à la fois l'ancrage des protéines, leur adressage au réticulum endoplasmique et la formation d'hétérodimères non-covalents E1-E2 (72).

La forte conservation de la plupart des sites de N-glycosylation d'E1 et E2 révèle l'importance de ces glycanes dans le cycle viral. En effet, plusieurs études ont démontré leur rôle majeur dans l'infection par HCV, via leur rôle dans la conformation des protéines d'enveloppe (71), le mécanisme d'entrée des virions (73), l'assemblage de la particule virale (74) et la résistance à la réponse immunitaire humorale par la formation d'un « bouclier » de glycanes autour des sites de fixation des anticorps neutralisants (75).

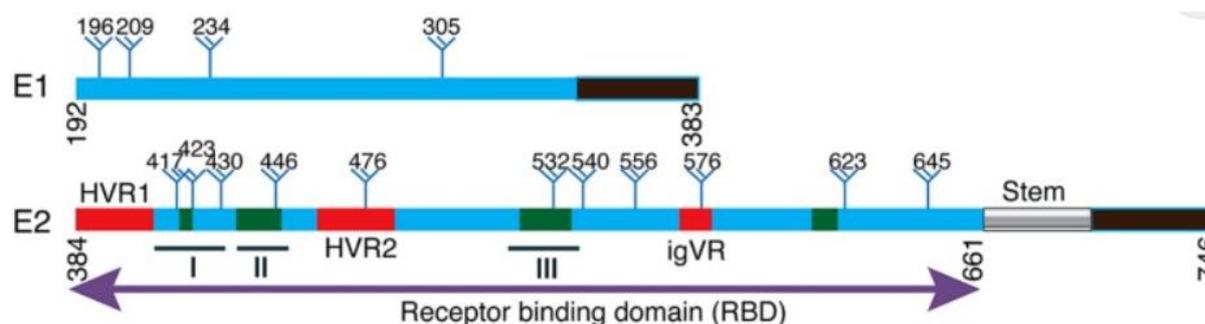


Figure 9 : schéma des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (tiré de (76)). Les deux protéines présentent un domaine transmembranaire à leur extrémité C-terminale (en noir). Leurs nombreux sites de glycosylation sont représentés (en bleu foncé, avec leur position indiquée), ainsi que les régions hypervariables de E2 (en rouge).

d) Protéines non-structurales

La protéine p7

La protéine p7 est une petite protéine hydrophobe de 63 résidus de la famille des viroporines. Elle est constituée de passages transmembranaires reliés par une boucle cytoplasmique et forme un canal ionique hexamérique de 42kda ((77), Figure 10). Cette protéine n'est pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral, puisque le réplicon subgénomique d'HCV, unité minimale de réplication du génome viral, ne contient pas la séquence codant pour p7 (78) ; mais n'est pas non plus une protéine

structurale. Le rôle de p7 est en revanche primordial pour l'assemblage des virions néoformés (79) et la sécrétion de particules infectieuses *in vivo* (80). En effet, il a été démontré que des mutations dans la protéine p7 ou son absence provoquaient une accumulation de particules capsid-like non-enveloppées à l'intérieur des cellules et causait l'accumulation de core sur les gouttelettes lipidiques (79–81).

Située dans la polyprotéine entre E2 et NS2, p7 est clivée par une signal-peptidase cellulaire, mais sa séparation de E2 n'est que partielle. Cet équilibre entre état clivé et non-clivé est essentiel pour une efficacité optimale de la production de particules infectieuses (82) et serait régulé par SPCS1 (Signal Peptidase Complex Subunit 1) (83). Par ailleurs, p7 protégerait également E2 d'une dégradation précoce pendant la phase de sécrétion des virions (84).

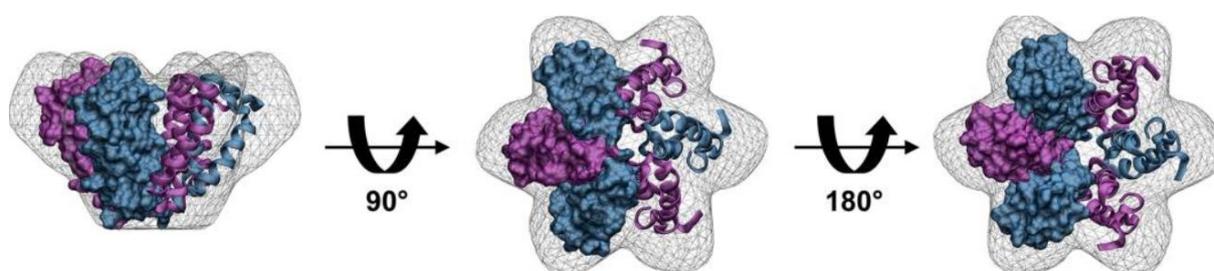


Figure 10 : structure hexamérique du canal ionique formé par p7 (tiré de (77)). Les couleurs sont alternées pour pouvoir distinguer les six protéines p7 formant l'hexamère mais ne décrivent pas de différences de séquence ou de structure.

La protéase NS2

NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa composée d'un domaine transmembranaire constitué de trois hélices hydrophobes, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (85), et d'un domaine protéase à cystéine cytosolique Zn^{2+} -dépendante, situé à l'extrémité C-terminale (86) (Figure 11). Localisée dans la polyprotéine entre p7 et NS3, son domaine protéase catalyse, avec l'aide du domaine 1 d'NS3 comme co-facteur interagissant avec les ions Zn^{2+} (87), le clivage NS2-NS3 et permet la libération d'une protéine NS3 fonctionnelle, essentielle à la réplication virale (88). La protéine NS2 en elle-même n'est pas nécessaire à la réplication, puisque sa séquence n'est pas présente dans le réplicon subgénomique (78). Au-delà de son activité protéase, NS2 joue un rôle essentiel dans l'étape d'assemblage des particules virales. En effet, elle participe par interaction directe avec E2 et NS3 à leur

recrutement à proximité des gouttelettes lipidiques (89). Par ailleurs, une analyse des mutations d'adaptation à la culture cellulaire de plusieurs souches d'HCV a identifié plusieurs résidus de NS2 nécessaires à l'assemblage (88,90,91).

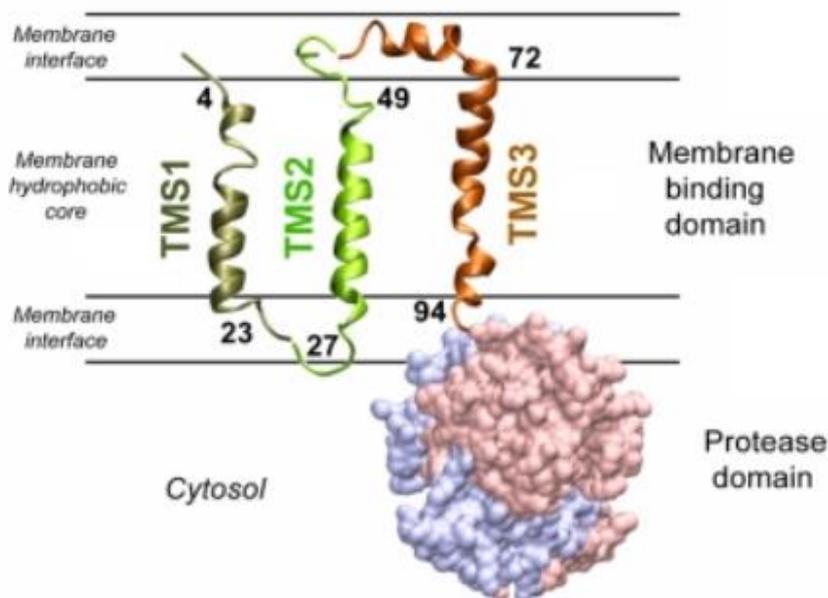


Figure 11 : structure de la protéine NS2 (tiré de (89)). Les trois passages transmembranaires sont représentés en brun (TMS1), vert (TMS2) et orange (TMS3), tandis que le domaine protéase, cytosolique, est représenté en bleu et rose.

La protéine NS3-4A (protéase et hélicase)

La protéine NS3 est une protéine bifonctionnelle de 70 kDa. Elle est constituée d'un domaine ARN-hélicase en N-terminal et d'un domaine sérine-protéase en C-terminal. Associée à NS4A, une petite protéine de 1,4 kDa agissant comme cofacteur de NS3, elle forme le complexe NS3-4A (92) (Figure 12) qui viendra cliver la polyprotéine d'HCV en 4 endroits, libérant les formes fonctionnelles, de NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Figure 7).

Le domaine sérine-protéase Zn^{2+} -dépendant de NS3, de 23 kDa, s'apparente à la famille des chymotrypsines et est actif en lui-même (93), cependant sa pleine efficacité n'est atteinte qu'en présence d'NS4A. Plus précisément, c'est un peptide de NS4A de 14 résidus d'acides aminés qui structure la partie hydrophobe de NS3 et assure sa bonne conformation 3D (94) (95). Enfin, le complexe NS3-4A est impliqué dans la réplication et l'assemblage d'HCV via le domaine C-terminal de NS4A (96), qui interagit avec E1 et participe à l'enveloppement des particules virales (97).

NS3-4A catalyse le clivage de la polyprotéine virale, mais aussi de protéines cellulaires. Le complexe joue un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée antivirale en clivant les protéines TRIF (98) et MAVS peroxydomale (99) et mitochondriale (100), respectivement responsables de l'activation des voies de signalisation IRF-3 et NFκB, qui déclenchent la sécrétion d'interférons. Ainsi, NS3-4A est non seulement indispensable pour la réplication et l'assemblage d'HCV, mais participe à sa persistance dans l'organisme et à sa chronicité en inhibant la réponse antivirale de l'hôte.

Le domaine hélicase de NS3 appartient à la famille des DExH (DEAH Box Helicase) (101), il interagit avec l'ARN viral. NS3-hélicase est essentiel à la réplication et à l'assemblage d'HCV (92). Les fonctions biologiques exactes de ce domaine sont encore mal connues, mais il semble être impliqué dans les changements de structure de l'ARN viral, notamment l'interconversion entre ARN simple-brin et ARN double-brin (102) mais aussi dans le déroulement du génome afin de favoriser sa traduction (103).

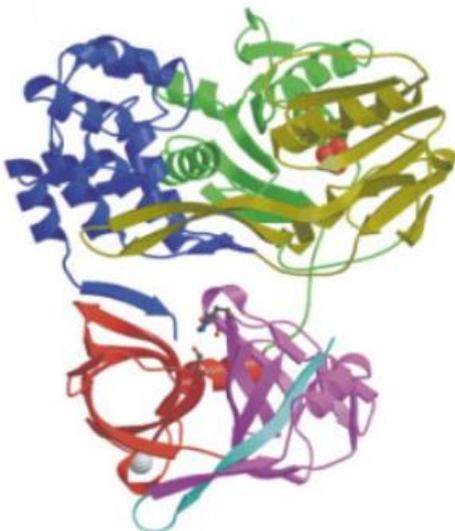


Figure 12 : représentation du complexe NS3-4A (adapté de (104)). Le complexe NS3-4A est composé de deux domaines, subdivisés en six sous-domaines : le peptide correspondant à NS4A (en bleu turquoise) et deux tonneaux β dans le domaine protéase (en rouge et magenta), deux sous domaines β - α - β (en jaune et vert) et un sous-domaine riche en hélices α (en bleu) dans le domaine hélicase.

La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa, libérée de la polyprotéine d'HCV par un double-clivage effectué par NS3-4A. Elle est composée de quatre segments transmembranaires et ses deux extrémités N-terminale et C-terminale forment des hélices amphipatiques orientées vers le cytoplasme (105), bien que l'extrémité N-terminale puisse être transloquée dans le RE (Figure 13). NS4B est essentielle à la réplication et à l'assemblage d'HCV. La principale fonction biologique de NS4B est d'induire des réarrangements membranaires en interagissant avec le RE des cellules infectées. Ces réarrangements membranaires, aussi appelés *membranous webs*, abritent les vésicules à double-membrane contenant les complexes de réplication d'HCV. Il a été démontré que l'expression seule de NS4B induisait la formation de membranous webs (106), et certains auteurs suggèrent qu'elle constituerait la protéine d'échafaudage des complexes de réplication d'HCV (105). Cependant, l'expression seule de NS4B induit la formation de vésicules à simple membrane, la co-expression de la phosphoprotéine NS5A est nécessaire à l'apparition de vésicules à double membrane (107).

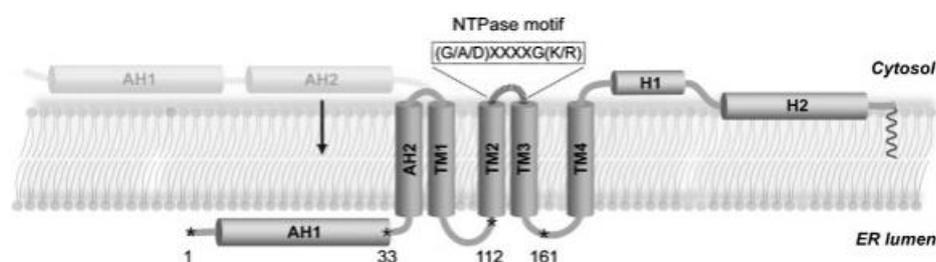


Figure 13 : schéma de la structure d'NS4B associée à la membrane du RE (tiré de (108)). Les quatre segments transmembranaires sont représentés (TM1-4), ainsi que les hélices amphipatiques de l'extrémité N-terminale (AH1-2) et C-terminale (H1-2). La translocation de l'extrémité N-terminale de la protéine vers la lumière est représentée par une flèche. Dans ce cas, AH2 devient un cinquième passage transmembranaire.

La protéine NS4B colocalise avec les autres protéines non-structurales dans les complexes de réplication d'HCV (105) et interagit avec NS3-4A, NS5A et NS5B (109). Par ailleurs, l'introduction de mutations dans la séquence de NS4B a un impact sur l'efficacité de la réplication virale. Selon la mutation en question, la réplication peut être perturbée, totalement abolie (110), ou augmentée (111). Une activité

ATP/GTPase de NS4B a aussi été mise en évidence par l'identification d'un motif d'interaction avec l'ATP GxxGxGK très conservé, qui ne peut être modifié sans impact sur la réplication virale (112).

NS4B interagit également avec l'ARN d'HCV via son domaine C-terminal (105). D'autres études suggèrent que NS4B participe à l'assemblage de nouvelles particules infectieuses, puisque certaines mutations ont causé une augmentation significative de la production de nouveaux virions indépendamment de l'efficacité de réplication (113). Cependant, le mécanisme exact de l'implication de NS4B dans l'assemblage reste encore inconnu.

Enfin, NS4B participe à la pathogenèse induite par HCV de plusieurs façons. Il a été démontré que cette protéine induisait un stress du RE notamment via l'induction de la réponse UPR et la libération de ROS (114). NS4B perturbe aussi le métabolisme des lipides en induisant le clivage de SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins), ce qui cause une activation de la synthèse d'acides gras et une accumulation de lipides (108).

La phosphoprotéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine hydrophile de 56 kDa (forme phosphorylée) à 58kDa (forme hyperphosphorylée) formant des dimères (115). Elle est constituée de trois domaines séparés par des séquences de faible complexité contenant de nombreux sites de phosphorylation (116) (Figure 14). Le domaine I, situé à l'extrémité N-terminale, est le domaine le plus conservé de la protéine. Il contient une hélice α amphipatique très conservée qui permet l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE au niveau des complexes de réplication (117), ainsi qu'un motif d'interaction avec l'ion Zinc (Zn^{2+}), lui aussi hautement conservé (116). Il est également capable d'interagir avec l'extrémité 3' de l'ARN viral (118) et est indispensable à la réplication d'HCV. Les domaines II et III de NS5A sont moins conservés, moins structurés et ont été moins étudiés, mais il est admis que le domaine II aurait aussi un rôle dans la réplication du génome viral (119) via son interaction avec CypA (Cyclophiline A, une protéine cellulaire qui favorise l'interaction avec l'ARN) (120), tandis que le domaine III serait nécessaire à l'assemblage mais largement dispensable pour la réplication (121). En effet, le domaine III de NS5A tolère l'insertion de gènes rapporteurs comme la GFP

sans impact sur l'efficacité de la réplication dans un modèle réplicon (122), mais des délétions dans ce domaine altèrent la localisation de NS5A à proximité des gouttelettes lipidiques (121).

NS5A est une protéine multifonctionnelle qui interagit avec de nombreux partenaires cellulaires (123), mais aussi avec la polymérase virale NS5B dont elle module l'activité (124). En plus de son rôle important dans la réplication et l'assemblage, NS5A présente également un effet inhibiteur sur l'efficacité de la traduction de l'ARN viral (125). Ces différentes fonctions semblent modulées par le degré de phosphorylation de la protéine (120,126,127). NS5A est aussi connue pour inhiber la sécrétion d'interféron α via la déphosphorylation de STAT1 (128).

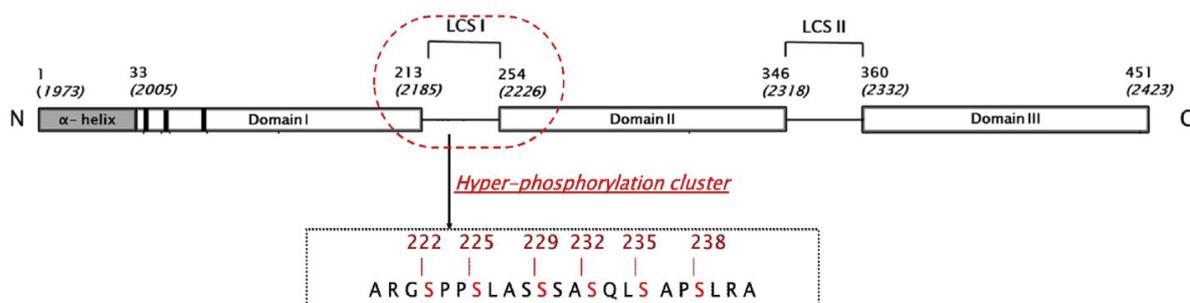


Figure 14 : représentation schématique de la structure d'NS5A (tiré de (120)). Le cercle rouge souligne la localisation des sérines impliquées dans l'hyperphosphorylation de la protéine.

La polymérase virale NS5B

NS5B est l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp pour *RNA-dependant RNA-polymerase*) virale, c'est elle qui synthétise les nouvelles copies d'ARN viraux à partir de l'ARN préexistant. Il a été démontré que NS5B était principalement capable d'initiation terminale de novo de la synthèse d'ARN (129), bien que des initiations internes minoritaires à la fonction inconnue aient récemment été décrites (130). C'est une protéine de 68 kDa constituée à l'extrémité C-terminale d'un domaine transmembranaire permettant son enchâssement dans la membrane du RE, d'une séquence *linker* et d'un long domaine N-terminal représentant 90% de la protéine et contenant son site catalytique. Le domaine polymérase de NS5B prend la forme d'une main droite et est divisé en trois sous-domaines : la paume, les doigts et le pouce (Figure 15) (131). La paume constitue le site actif de l'enzyme, tandis que le pouce et

les doigts forment un tunnel guidant l'ARN simple brin vers la paume de NS5B (132) (133). Les nucléotides sont quant à eux acheminés vers le site actif via un autre tunnel chargé positivement (134). L'activité de NS5B est modulée par des protéines virales (NS3, NS5A) (135) et cellulaires (136). Il a notamment été décrit qu'elle interagissait avec la cyclophiline B, qui module son interaction avec l'ARN (137). Comme beaucoup de polymérases virales, NS5B ne dispose pas d'un système de *proof-reading*, ce qui induit l'apparition fréquente de mutations dans le génome d'HCV et cause sa grande variabilité génétique.

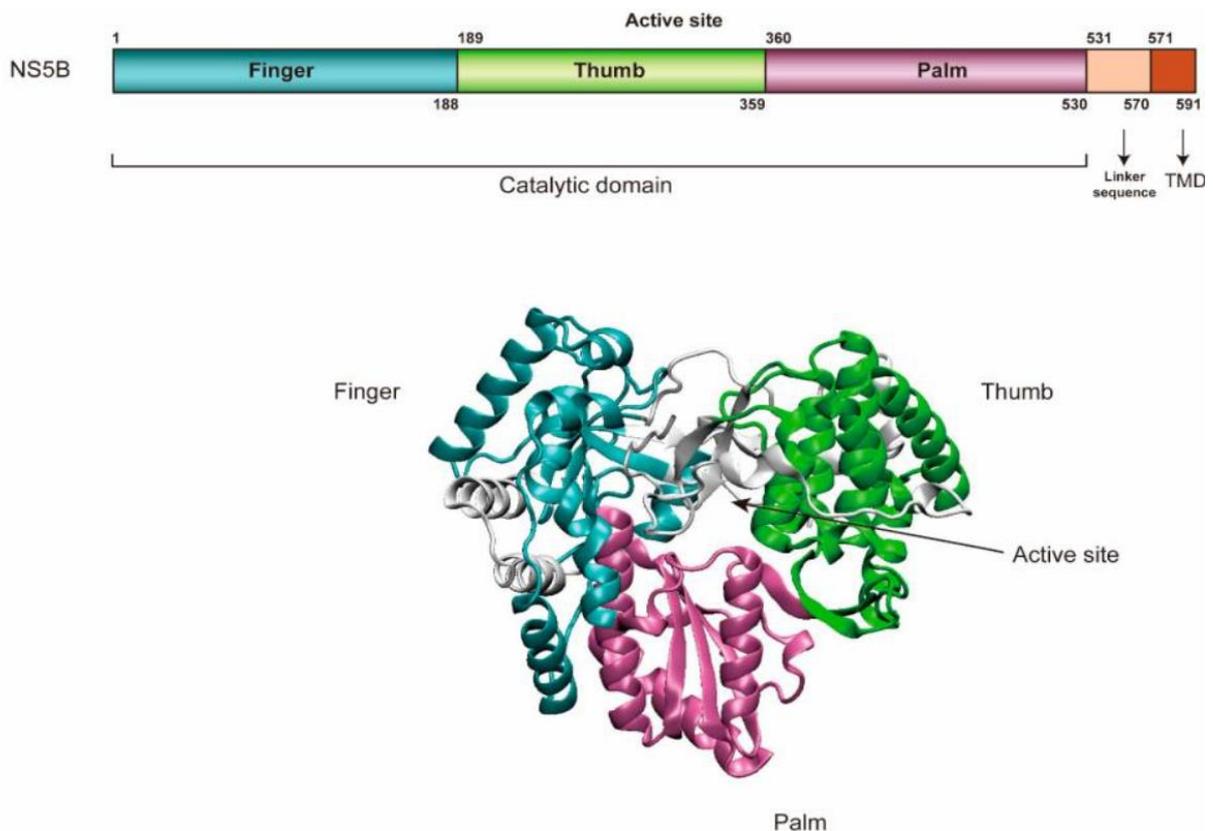


Figure 15 : représentations schématisques linéaire et 3D d'NS5B (tiré de (131)). La protéine est composée d'un domaine transmembranaire (TMD), d'une séquence linker et d'un domaine polymérase divisé en trois sous-domaines formant une main droite : la paume (rose), les doigts (bleu) et le pouce (vert) d'NS5B.

e) La particule virale

La particule virale d'HCV se présente sous une forme sphérique ou ovoïde dont le diamètre varie de 30 à 80 nm (138). Elle se compose d'une nucléocapside, formée par la protéine core, contenant l'ARN viral (ARN+ simple brin) et entourée d'une enveloppe lipidique, dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines d'enveloppe E1

et E2 (Figure 16). En plus de E1 et E2, l'enveloppe lipidique est associée à des lipoprotéines d'origine cellulaire (notamment les apolipoprotéines comme Apo B, Apo C, Apo E, Apo M...) (139), qui participent à donner sa morphologie à la particule virale (140), on parle de particules lipovirales hybrides ou lipoviriparticules (LVP). L'interaction d'HCV avec les lipoprotéines, particulièrement avec ApoE, semble permettre au virus de mieux échapper aux anticorps neutralisants (141).

Les LVP d'HCV ont une composition lipidique proche de celle des *Low Density Lipoproteins* (LDL) et des *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) (142,143), elles contiennent des lipoprotéines, des phospholipides (phosphatidylcholine, sphingomyéline) et du cholestérol estérifié (141). Les LVP retrouvées dans les serums des patients infectés présentent également une hétérogénéité de taille (30 à 80 nm de diamètre) et de densité (de 1.03 à 1.25 g.mL⁻¹), une faible densité étant associée à une plus grande infectiosité (138). C'est la fusion des LVP nouvellement sécrétées avec les lipoprotéines du sérum qui confère aux particules virales cette densité variable (141).

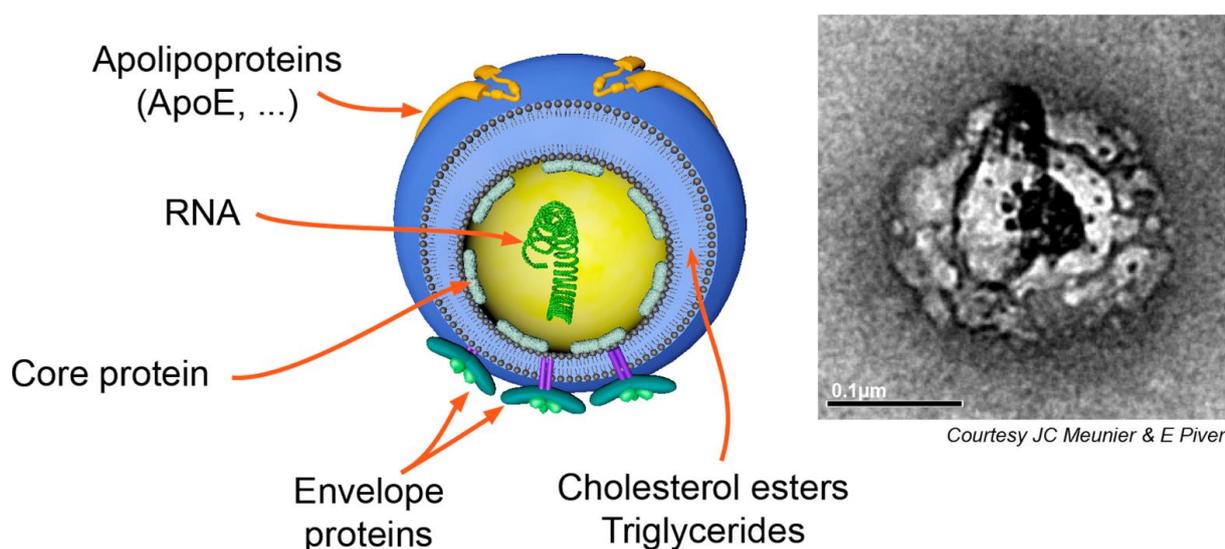


Figure 16 : la particule virale d'HCV (tiré de (144)). (A) Schéma de la particule virale. (B) Particule virale observée au microscope électronique à transmission (MET).

2) Modèles d'étude d'HCV

Dans les années suivant la découverte de l'agent responsable de l'hépatite non-A non-B en 1989 (3), la recherche ne disposait que de très peu d'outils pour étudier HCV. En effet, pour une raison encore inconnue, les particules virales circulant chez les patients infectés sont incapables d'infecter des lignées cellulaires immortalisées d'origine hépatique. Ce manque de modèles d'étude a représenté pendant des années un frein important à l'avancée des travaux scientifiques, mais au fur et à mesure, des outils d'étude d'HCV ont été développés. Ils nous permettent maintenant d'investiguer chaque étape de l'infection par HCV, aussi bien *ex vivo* (modèles en culture cellulaire) qu'*in vivo* (modèles animaux).

a) Les modèles d'étude *ex vivo*

Le système Réplicon

En 1999, soit dix ans après la découverte d'HCV, un premier outil d'étude est mis au point : le système réplicon. Lohmann *et al.* parviennent à déterminer l'unité minimale de réplication du génome viral (78). C'est un ARN tronqué autorépliatif, où seules ont été conservées les séquences nécessaires et suffisantes à l'initiation et au maintien de la réplication virale dans des cellules humaines. Initialement mis au point à partir de la souche Con1 de génotype 1b, le premier réplicon subgénomique (SGR pour *subgenomic replicon*) conserve les séquences codant les protéines non-structurales NS3 à NS5B, sous contrôle de l'IRES de l'EMCV (*encephalomyocarditis virus*). Un second IRES (l'IRES d'HCV cette fois) permet l'expression d'un gène de résistance à un antibiotique (comme la néomycine) permettant la sélection d'une population cellulaire répliquant l'ARN viral, ou d'un gène rapporteur (comme la luciférase) permettant de mesurer l'efficacité de réplication du SGR (Figure 17). La mise au point du système réplicon a représenté une réelle révolution dans la recherche sur HCV au début des années 2000 et ce modèle est encore aujourd'hui toujours utilisé dans les laboratoires. Le système réplicon permet d'étudier uniquement l'étape de réplication du génome viral en s'affranchissant des étapes d'entrée et d'assemblage, c'est également un modèle permettant d'avoir accès à du matériel situé dans des locaux au niveau de sécurité biologique plus bas qu'avec le modèle infectieux.

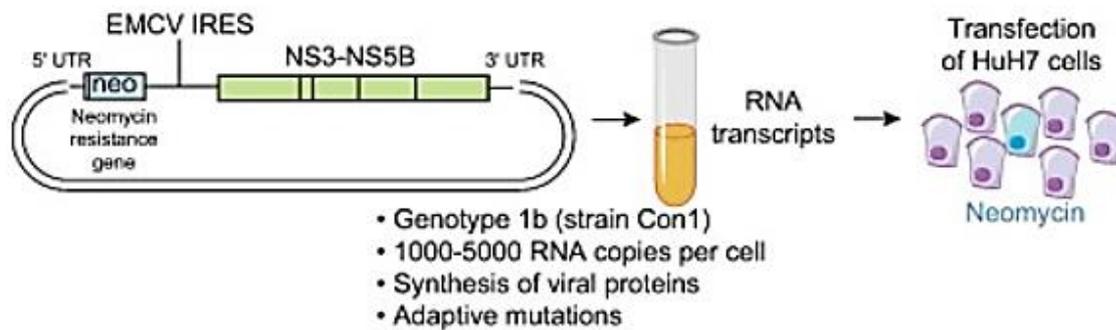


Figure 17 : principe du système réplicon en culture cellulaire (tiré de (145)). L'ARN bicistronique du réplicon contient un premier IRES contrôlant l'expression d'un gène de résistance à la néomycine et un deuxième IRES (EMCV) permettant l'expression des protéines NS3 à NS5B d'HCV (souche Con1). Les régions 5' et 3' UTR sont également celles de la souche Con 1. Des cellules Huh-7 sont transfectées avec l'ARN du réplicon subgénomique et sélectionnées par ajout de néomycine dans le milieu de culture.

Le système pseudoparticule (HCVpp)

En 2003, la mise au point des HCVpp par Bartosch *et al.* a représenté la deuxième grande avancée dans la recherche de modèles d'étude d'HCV. Les pseudoparticules consistent en une capsidе rétrovirale entourée d'une enveloppe pseudotypée avec les glycoprotéines E1 et E2 et contenant un gène rapporteur (initialement la GFP) (146). Ces pseudoparticules sont obtenues par la co-transfection dans des cellules HEK-293T de trois plasmides codant respectivement les protéines E1 et E2 d'HCV, les protéines rétrovirales gag et pol, et le gène rapporteur. Les surnageants des cellules transfectées sont ensuite récoltés et les HCVpp sont concentrées par ultracentrifugation avant d'infecter d'autres cellules cibles (Figure 18). Ce modèle permet d'étudier l'entrée d'HCV grâce à des pseudoparticules infectieuses présentant des complexes E1-E2 fonctionnels, le gène rapporteur (GFP ou luciférase) fournit également une mesure quantitative de l'entrée virale dans les cellules-cibles. Les HCVpp ont également permis l'étude du rôle de E1 et E2 dans l'entrée virale (147), l'identification de facteurs d'attachement et d'entrée (148) et le test d'anticorps neutralisants (149). Une des limites de ce modèle est le manque d'association de la lipoprotéine ApoE avec les HCVpp contrairement aux particules virales infectieuses, ce qui peut induire des différences.

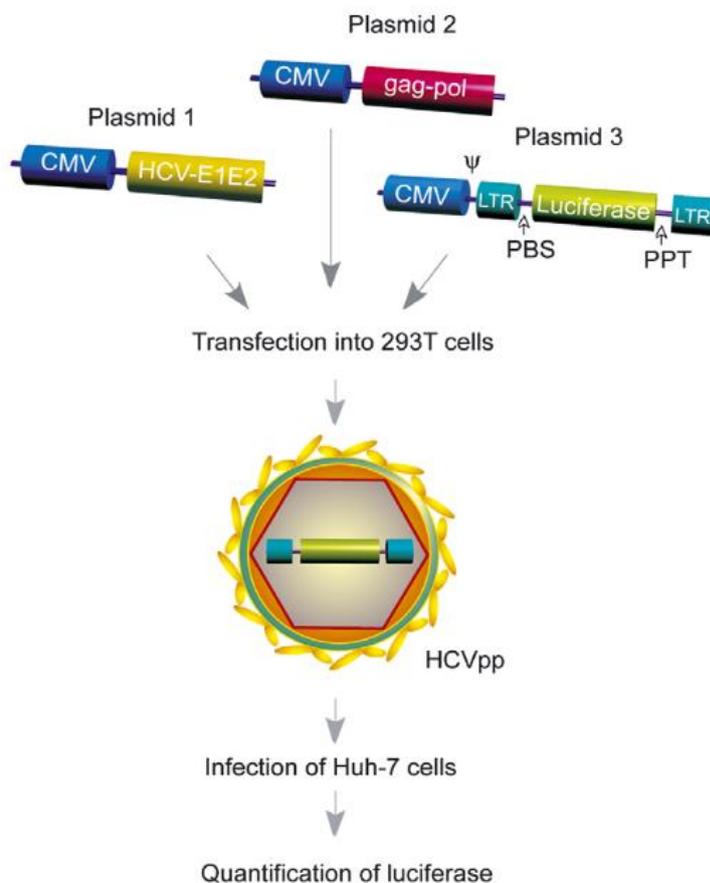


Figure 18 : production des pseudoparticules HCVpp dans les cellules HEK-293T (tiré de (150)). La formation des HCVpp nécessite la co-transfection de trois plasmides, le premier exprimant les protéines d'enveloppe d'HCV, le second exprimant les protéines rétrovirales gag et pol, le troisième exprimant le gène rapporteur (ici la luciférase).

Le système infectieux (HCVcc)

C'est finalement en 2005 que Wakita et al. parviennent à obtenir un modèle de virus infectieux en culture cellulaire (151). Ce premier clone infectieux provient d'un échantillon de patient Japonais ayant contracté une hépatite C fulminante. Cette souche, classée comme appartenant au génotype 2a et appelée JFH1 (*japanese fulminant hepatitis clone 1*), a été décrite et caractérisée en 2001 puis 2003 par Kato et al. (152,153). JFH1 présente une séquence très éloignée des autres souches de même génotype, principalement au niveau de l'extrémité 5' UTR et des séquences codant pour core, NS3 et NS5A (152), c'est toujours à l'heure actuelle la seule souche ne nécessitant pas de mutations d'adaptation à la culture cellulaire. La construction d'un réplicon de souche JFH1 a également permis de constater une efficacité de réplication bien supérieure aux autres réplicons disponibles (20 fois supérieure à

l'efficacité de réplication de Con1), et ce sans mutations d'adaptation (153). C'est quatre ans après la description de JFH1 que Wakita *et al.* parvinrent à former des particules infectieuses (ou HCVcc) en culture cellulaire. L'ADNc de JFH1 a été mis sous le contrôle du promoteur T7 afin de générer l'ARN d'HCV in vitro, avant de l'électroporer dans des cellules Huh-7 (Figure 19). Les particules infectieuses excrétées dans le milieu de culture des cellules électroporées sont appelées HCVcc. Elles sont sphériques, d'un diamètre d'environ 55 nm et d'une densité de 1,15 à 1,17 g.mL⁻¹ (151), donc de taille moyenne et de densité plutôt élevée en comparaison avec les particules infectieuses présentes dans le sérum des patients chroniquement infectés. Bien que les cellules Huh-7 soient infectables par les HCVcc, il a été démontré que de meilleurs titres infectieux étaient obtenus en utilisant des lignées dérivées des Huh-7, comme les Huh-7.5 (154) ou les Huh-7.5.1 (155). Les particules virales produites en laboratoire sont également capables d'infecter des animaux sensibles à HCV comme les chimpanzés, mais sont moins infectieuses que les particules virales récoltées dans les échantillons de patients chroniquement infectés. Cela est probablement lié à la densité plus importante des HCVcc (156). Plus tard, d'autres souches d'HCV ont été adaptées au modèle infectieux, comme les souches TNcc (génotype 1a) (157), GLT1 (génotype 1b) (158), JFH2 (génotype 2a) (159), DBN3a (génotype 3a) (160).

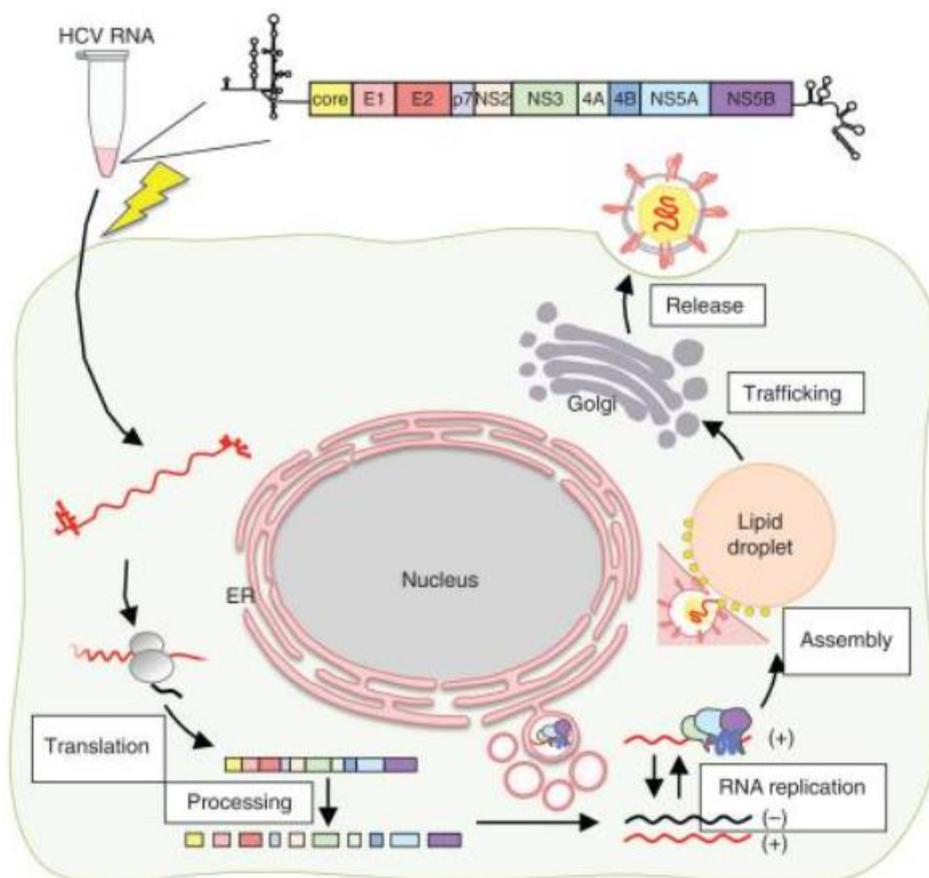


Figure 19 : production de particules infectieuses HCVcc en culture cellulaire (tiré de (161)).

b) Les modèles animaux

Le modèle chimpanzé

Historiquement, le premier modèle animal à être utilisé pour étudier l'hépatite C est le modèle chimpanzé (*Pan troglodytes*). En 1997, deux équipes parviennent en parallèle à développer un clone ARN infectieux par inoculation intra-hépatique à des chimpanzés, bien que le même clone ne parvienne pas à produire des particules virales en culture cellulaire (162,163). Cela a permis de démontrer pour la première fois que ces équipes disposaient du génome viral complet. De la découverte de l'hépatite non-A non-B à 2011, le modèle chimpanzé constitua le principal modèle animal dans l'étude d'HCV, jusqu'à ce que l'utilisation expérimentale de chimpanzés soit remise en question pour des raisons éthiques. De par la proximité génétique avec l'homme, le modèle chimpanzé a permis de tester les premiers candidats-vaccins et d'étudier la réponse immunitaire à l'infection par HCV (164).

Cependant, certaines différences notables démontrent les limites de ce modèle. En effet, les chimpanzés développent généralement une hépatite C moins sévère que les humains, avec une phase aiguë moins symptomatique et un meilleur taux de guérison spontanée (entre 40 et 67% selon les études contre en moyenne 30% chez l'Homme) (164). De même, l'évolution de la phase chronique est moins sévère, et jusqu'alors un seul cas d'hépatocarcinome causé par HCV a été décrit chez le chimpanzé (165). Les causes de ces différences n'ont pas encore été déterminées.

L'interdiction progressive de l'utilisation des chimpanzés à des fins de recherche a poussé la communauté scientifique à trouver de nouveaux modèles animaux. La susceptibilité d'autres animaux à l'infection par HCV a été testée, mais très peu de modèles pertinents ont émergé de ces recherches (164). Par exemple, il a été démontré que le toupaye de Belanger (*Tupaia belangeri*) était susceptible à l'infection par HCV (166), mais que le virus ne provoquait qu'une infection bénigne sans passage à la chronicité (167).

Les modèles souris

Les rongeurs sont naturellement résistants au virus de l'hépatite C, cependant ce sont les espèces les plus utilisées en expérimentation animale. Ainsi, la communauté scientifique a mis au point plusieurs modèles murins pour l'étude de l'hépatite C, utilisant principalement trois approches différentes : l'utilisation de souches virales adaptées, de souris transgéniques ou la xénogreffe (Figure 20).

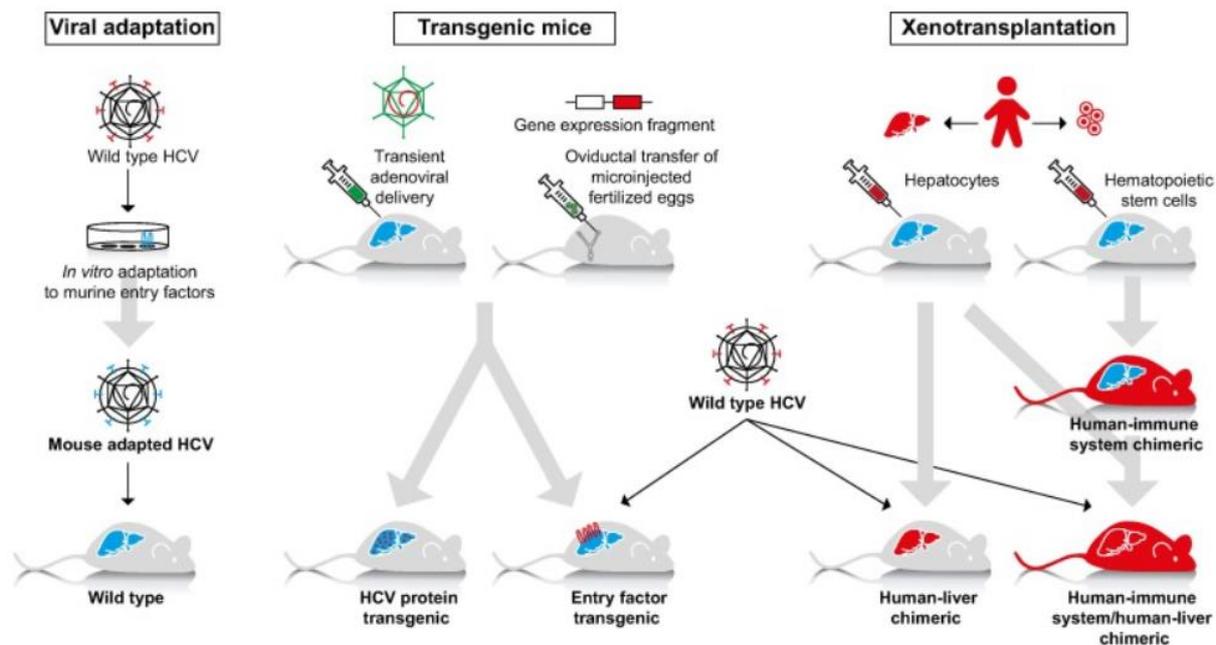


Figure 20 : principales approches dans l'élaboration d'un modèle murin pour l'étude d'HCV (tiré de (168)).

Souches virales adaptées

Les souches virales adaptées au modèle murin sont obtenues par culture à long terme d'HCV en présence de cellules de souris ou exprimant les homologues murins des facteurs d'entrée nécessaires à l'endocytose des virions. En utilisant cette méthode, des mutations de E1 et E2 permettant l'entrée d'HCV dans des cellules de souris ont été découvertes par Bitzegeio *et al.* (169). Cette souche adaptée est capable d'infecter une lignée immortalisée de foie murin et de produire des particules infectieuses (170). Cependant, aucune étude ne fait mention de l'utilisation *in vivo* de cette souche adaptée, ce modèle n'est plus très utilisé et les revues récentes sur le sujet n'en font plus mention.

Souris transgéniques

Plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant tout ou partie des protéines virales ont été créées (164,171). Les souris exprimant la totalité de la polyprotéine virale développent des symptômes hépatiques similaires aux patients humains : stéatose hépatique, fibrose et hépatocarcinome (168). Cependant, ces souris étant rendues immunotolérantes aux protéines virales, l'environnement inflammatoire dans lequel se développe la pathogenèse d'HCV est très différent du contexte nécrotico-

inflammatoire observé chez l'Homme (164). Malgré ces réserves, ce modèle est toujours utilisé au moment de l'écriture de ce manuscrit.

Des souris génétiquement humanisées ont également été développées. Ces souris expriment les facteurs d'entrée humains nécessaires à l'infection et ont permis l'étude d'inhibiteurs de l'entrée virale et le test de candidats vaccins (168,172). Cependant, bien que l'entrée d'HCV dans les hépatocytes des souris humanisées soit constatée, la réponse immunitaire murine empêche la réplication virale et la sécrétion de particules infectieuses. En croisant des souris exprimant les facteurs d'entrée avec des souris déficientes en récepteurs de STAT1, récepteurs de IFN α/β , IRF-1 ou IRF-7, Dorner *et al.* ont obtenu des individus immunodéficients permissifs à l'infection par HCV. Ce croisement a permis pour la première fois la reproduction *in vivo* du cycle complet du virus et la production de particules infectieuses dans un modèle murin (173). Cependant, la réplication d'HCV dans le foie de ces souris humanisées immunodéficientes reste peu efficace, ce qui suggère que d'autres incompatibilités hôte-pathogène encore non-identifiées subsistent (164).

Xénotransplantation

Le tropisme du virus de l'hépatite C étant particulièrement robuste, la xénotransplantation d'hépatocytes humains dans un organisme xénoreceveur a été mise au point. Les premières xéno greffes de fragments de foie de patients HCV-positifs sur des souris ont été réalisées en 1995 par Galun et al. en utilisant des souris BNX (*beige/nude/X-linked immunodeficient*) irradiées pour recevoir une greffe de moelle osseuse de souris SCID (*severe combined immunodeficient*) (174), mais d'autres modèles de souris xénotransplantées ont également été mis au point (164). De l'ARN d'HCV est détecté dans les serums de souris greffées, que ce soit avec des fragments de foies de patients chroniquement infectés ou avec des fragments de foies de patients sains ayant été mis en contact avec le virus avant la transplantation (174). Ce modèle a permis de tester de nombreux antiviraux, il ne s'est néanmoins jamais pleinement démocratisé à cause des difficultés d'approvisionnement en fragments de foie de patients sains ou HCV-positifs. En outre, le caractère fortement immunodéprimé des souris transplantées limitait fortement l'utilisation de ce modèle, notamment dans l'étude de la réponse immunitaire, de la pathogenèse, des stades précoces de l'infection ou du test de candidats-vaccins (171). Ce dernier point peut

être compensé par la mise au point de modèles de souris doublement xenotransplantées avec des fragments de foie et des cellules souches hématopoïétiques CD34+ provenant de donneurs humains. Ces souris sont immunocompétentes et leur système immunitaire est « humanisé » (175,176), elles développent une réponse cellulaire T anti-HCV et une fibrose hépatique lorsqu'elles sont infectées (176).

Une autre méthode consiste à transplanter des hépatocytes humains à des embryons de souris transgéniques Alb-uPA. Ces souris sont porteuses de quatre gènes d'urokinase contrôlés par le promoteur de l'albumine, dont l'expression accélère la mort des hépatocytes transgéniques. L'absence de cette mutation dans les hépatocytes humains transplantés leur confère un avantage répliatif significatif par rapport aux hépatocytes murins, ce qui permet d'obtenir des souris au foie humanisé. Ces souris sont susceptibles à l'infection par HCV et présentent une virémie comparable à celle retrouvée dans les échantillons de patients humains chroniquement infectés. Elles développent une infection persistante, détectable jusqu'à 17 à 35 semaines post-infection, qui s'explique peut-être par la faible immunocompétence des souris plutôt que par un véritable passage à la chronicité (177).

Virus homologues

Le virus de l'hépatite C étant particulièrement spécifique à l'Homme, les modèles animaux présentés ci-dessus s'éloignent tous plus ou moins des conditions physiologiques de l'infection. Une alternative moins artificielle consiste à étudier des virus phylogénétiquement proches d'HCV infectant naturellement des mammifères. Jusqu'en 2011, le seul autre membre connu du genre Hepacivirus était le GBV-B (Georges Barker virus B, infectant les tamarins mais d'origine inconnue). Des découvertes récentes ont montré l'existence de nombreux autres hepacivirus comme le NPHV (*non-primate hepacivirus*, aussi appelé EqHV pour *equine hepacivirus*, infectant les chiens et les chevaux) plusieurs hepacivirus de rongeurs, de chauve-souris de vaches, de requins, etc... (Figure 21).

Le GBV-B fut le premier homologue d'HCV à être utilisé en tant que modèle pour étudier la réponse immunitaire associée à une hépatite C auto-résolutive. GBV-

B induit chez le tamarin une hépatite aiguë auto-résolutive et cause le même type de réponse immunitaire que l'infection par HCV en phase aiguë, caractérisée par l'apparition de lymphocytes T ciblant les protéines non-structurales (178). Le plus gros défaut de ce modèle est le fait que le GBV-B n'induit pas d'hépatite persistante chez les tamarins, ce qui empêche toute recherche concernant la chronicité, caractéristique majeure de l'hépatite C (171).

Les recherches sur les homologues d'HCV se sont ensuite concentrées sur le NPHV, le plus proche cousin d'HCV d'après les analyses phylogénétiques (environ 50% d'homologie de séquence). Ce virus infecte communément les chevaux, mais n'est que rarement persistant (179), ce qui, de la même manière que pour le GBV-B, limite son intérêt en tant que virus modèle.

La découverte de nombreux RHVs (*rodent hepaciviruses*) a permis l'émergence de nouveaux modèles d'études. La souche RHV-rn1 (RHV from *Rattus norvegicus* species-1), capable d'infecter à la fois les rats et les souris, est la plus étudiée. RHV-rn1 provoque chez la souris immunocompétente une hépatite aiguë, généralement auto-résolutive après deux à cinq semaines d'infection en fonction de la lignée de souris infectée. Une hépatite persistante a malgré tout été observée chez les souris immunodéprimées (180). A l'inverse, RHV-rn1 provoque chez le rat une hépatite chronique évolutive, associée à une inflammation du foie et au développement de stéatose macro et micro-vésiculaire (181). La caractérisation d'un virus-modèle persistant a finalement permis l'étude de la pathogenèse et de la réponse immunitaire des hepacivirus dans un contexte d'hépatite chronique (182) ainsi que de vaccins basés sur la réponse immunitaire T protégeant contre la persistance de RHV-rn1 (183). Il est cependant nécessaire de préciser que les candidats-vaccins anti-HCV basés sur la réponse immunitaire T se sont jusqu'à aujourd'hui révélés inefficaces. La principale limite du modèle RHV-rn1 est la faible homologie de séquence avec HCV. Des perspectives sont peut-être à chercher du côté de la construction de chimères RHV/HCV, mais il n'est pas certain que de telles chimères constituent un pathogène infectieux. Cette approche avait été tentée en construisant des chimères GBV-B/HCV, mais rien de concluant n'en était advenu (171).

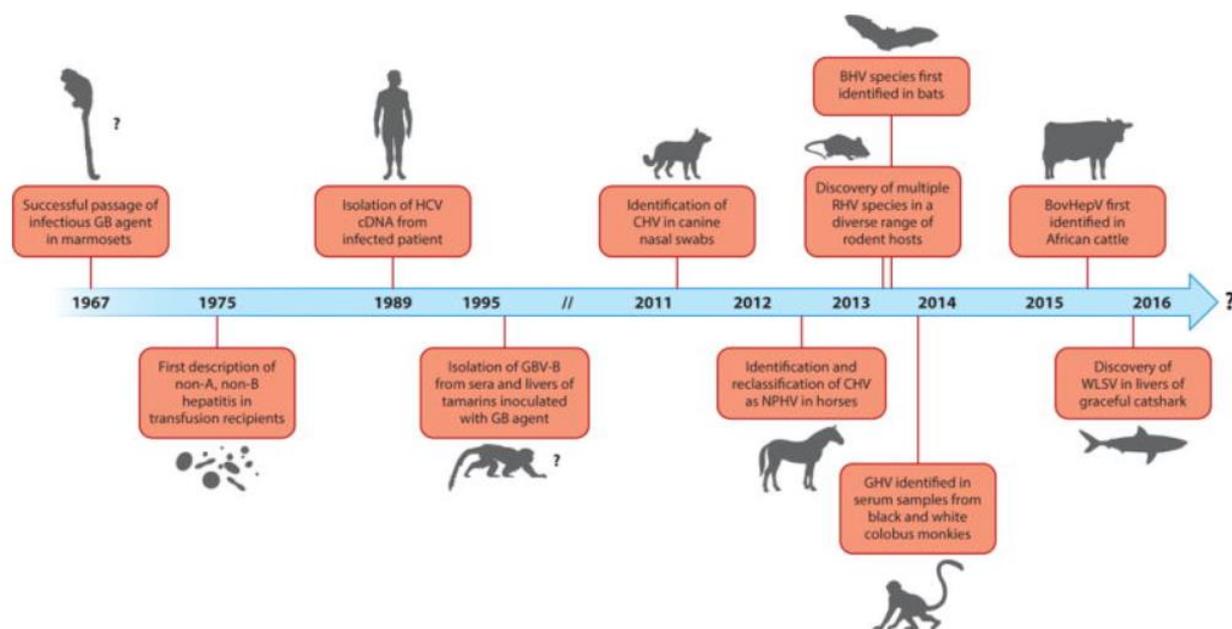


Figure 21 : frise chronologique de la découverte des différents virus du genre **Hepacivirus** (tiré de (51)).

Model	GBV-B	NPHV	RHV mouse	RHV rat
Protein similarity HCV (NS5B) ^a	37%	59%	40%	40%
Genotypes	1	1	1	>2
Reverse genetic system	Yes	Yes	Yes	Yes
Cell culture system	No	No	Yes	Yes
Cell tropism	Hepatocytes	Hepatocytes	Hepatocytes	Hepatocytes
Acute infection	Yes	Yes	Yes	Yes
Chronic infection	No	Rare	No	Yes
Acute liver disease	Yes	Mild	Mild	Mild
Chronic liver disease	No	No	No	Yes
HCV antiviral sofosbuvir	Not known	Not known	Not known	Yes
Use for vaccination studies	No	No	No	Yes

Tableau 1 : comparaison des différents homologues d'HCV (tiré de (171))

3) Le cycle cellulaire d'HCV

Le cycle de vie du virus de l'hépatite C se divise en trois grandes étapes : l'entrée de la particule virale dans la cellule, la réplication et traduction de l'ARN viral et l'assemblage des nouvelles particules infectieuses (figure 22).

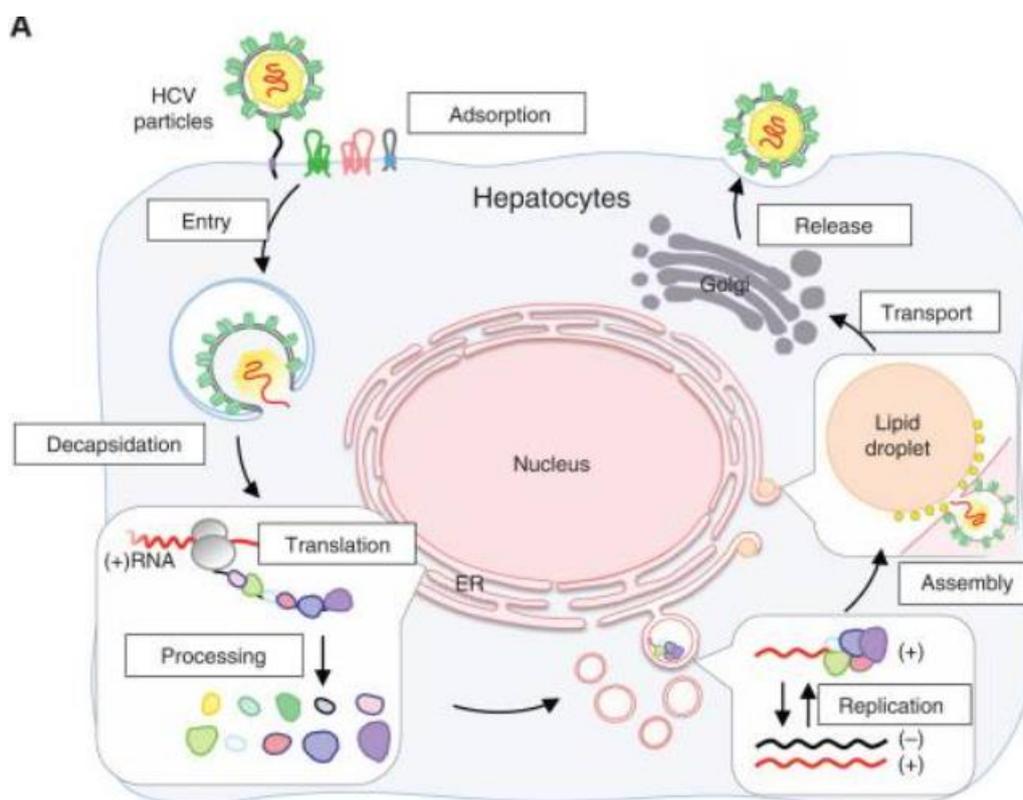


Figure 22 : cycle cellulaire du virus de l'hépatite C (tiré de (161)).

a) Entrée de la particule virale dans la cellule-hôte

L'entrée d'HCV dans les hépatocytes peut se diviser en cinq étapes clé : l'attachement de la lipo-viro-particule à la membrane des hépatocytes, la translocation des particules au niveau des jonctions serrées, l'internalisation par endocytose, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et la libération de l'ARN viral (Figure 23).

Dans un premier temps, les LVP s'attachent à la membrane basolatérale des hépatocytes grâce à l'interaction d'ApoE, une apolipoprotéine présente à la surface des LVP, avec des protéines présentes sur la membrane des futures cellule-hôtes. ApoE interagit avec plusieurs facteurs d'attachement cellulaires tels que les GAG (glycosaminoglycanes), les HSPGs (heparan sulfate proteoglycanes) (184) et les LDL/VLDL-R (LDL/VLDL-receptors) (185). Ces interactions non-spécifiques communes à de nombreux virus sont faibles mais permettent l'attachement initial des LVP à la membrane et leur interaction avec des facteurs d'entrée spécifiques tels que SR-B1 (Scavenger Receptor B1), qui interagit avec ApoE (186), et CD81, qui interagit avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 (187). Les LVP interagissant avec CD81 interagissent ensuite directement ou indirectement avec CLDN 1 (Claudine 1) et OCLN (occludine), deux protéines des jonctions serrées (188) (189). Le lieu de cette interaction est encore aujourd'hui l'objet de controverses. En effet, on a longtemps considéré que les particules virales associées à CD81 étaient transloquées au niveau des jonctions serrées (188) sous l'effet cofacteur d'entrée EGFR (epidermal growth factor receptor) (190), mais des études plus récentes tendent plutôt à prouver que les protéines CLDN et OCLN sont recrutées hors des jonctions serrées (191). Les facteurs d'entrée spécifiques participent à la détermination du tropisme d'HCV. En effet, SR-B1 et CLDN1 contribuent au tropisme hépatique du virus, tandis que CD81 et OCLN sont responsables du tropisme humain-spécifique (en comparaison avec CD81 et OCLN murins, qui ne permettent pas l'entrée virale) (187,192).

L'internalisation de la particule virale se fait par endocytose clathrine-dépendante (193) et nécessite la formation d'un complexe CD81/CLDN1 (194). Il a d'ailleurs été montré que le complexe CD81-CLDN1 était lui aussi internalisé par endocytose avec le virion (195). La vésicule endocytique est ensuite transportée via le réseau de microtubules jusqu'aux endosomes. L'acidification des endosomes par des ATPases de type V (187) induit probablement un changement conformationnel des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Les mécanismes exacts de la fusion sont encore mal connus, mais il semblerait que la protéine de fusion d'HCV soit E1, qui grâce à l'effet chaperonne-like de E2, forme des homotrimères (194). Les trimères E1 induiraient la fusion de la membrane endosomale avec l'enveloppe virale, qui aboutit à la formation d'un pore de fusion permettant la libération de la capsid virale dans le

cytoplasme (196). Il est cependant probable qu'une action coordonnée des deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 soit nécessaire pour induire la fusion (197).

Le virus de l'hépatite C est également capable de se transmettre de cellule à cellule. Ce mécanisme est crucial pour la persistance d'HCV in vivo, parce qu'il affranchit le virus de la menace des anticorps neutralisants (198,199). Des études récentes ont démontré l'importance des protéines E1, E2 et p7 dans ce mode de transmission (200). Le mécanisme exact de cette transmission de proche en proche n'est pas encore élucidé, mais plusieurs facteurs cellulaires tels que CD81, SR-B1, CLDN1, OCLN et LDL-R semblent impliqués dans le processus. Cependant, des transmissions cellule-à-cellule ont aussi été observées en l'absence de CD81 et SR-B1 (201). En effet, de l'ARN viral a été détecté dans des exosomes sécrétés par les cellules infectées (202). Ces exosomes contenant l'ARN d'HCV, résistants aux anticorps neutralisants, sont capables d'infecter des cellules saines, qu'ils soient issus de cellules en culture infectées par des HCVcc (202,203) ou d'échantillons de patients chroniquement infectés (204).

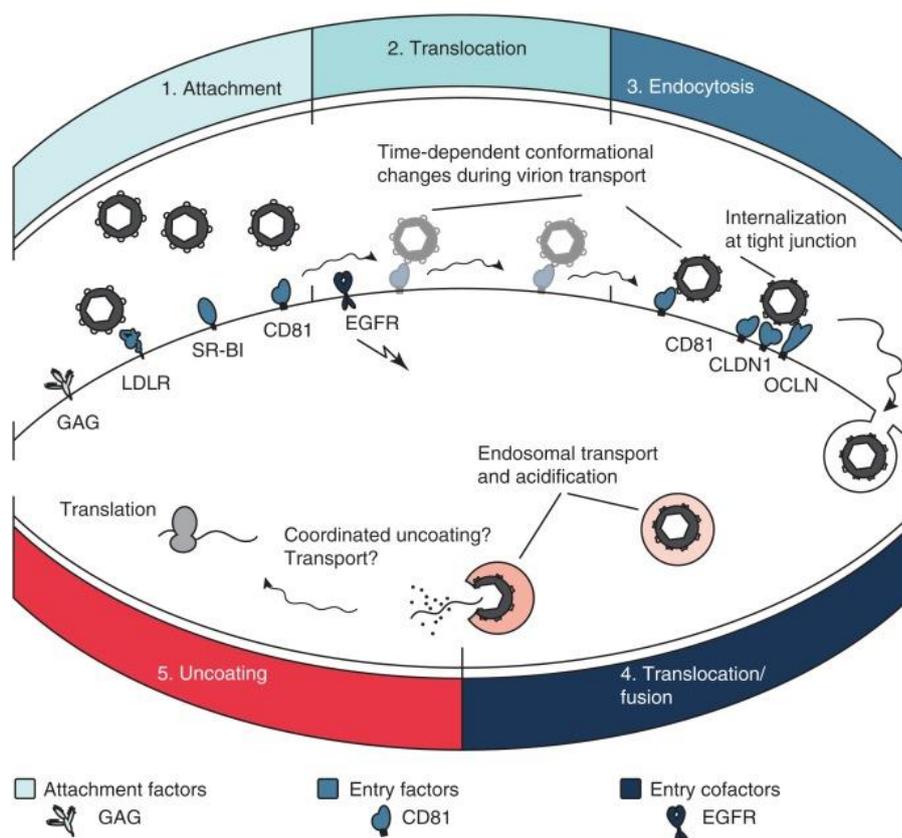


Figure 23 : représentation schématique et temporelle des cinq étapes de l'entrée d'HCV (tiré de (187)).

b) Réplication et traduction

Une fois l'ARN libéré de sa capsid dans le cytoplasme, il est directement traduit par la machinerie ribosomale. La traduction s'initie au niveau de l'IRES situé à l'extrémité 5'UTR (205) et conduit comme décrit précédemment à la synthèse de la polyprotéine, clivée pendant et après la traduction par des protéases virales et cellulaires. La réplication du génome viral est ensuite mise en place. Dans un premier temps, un brin d'ARN négatif est synthétisé par complémentarité à partir de l'extrémité 3' du brin codant. Ce brin négatif sert de matrice à la synthèse de nouveaux brins positifs, produits dans des proportions cinq à dix fois plus importantes que les brins négatifs. Ces nouvelles copies d'ARN codant serviront à la traduction, à la réplication et à l'assemblage des nouvelles particules virales (206). La réplication d'HCV intervient au niveau de vésicules à double-membrane (DMV pour *double-membrane vesicles*), dérivées du RE (Figure 24). Ces remaniements de la membrane du RE sont principalement imputables aux protéines NS4B (qui cause la formation de *membranous web*) et NS5A (qui induit spécifiquement la formation de DMV) (131).

Elles sont de taille variable mais présentent en moyenne un diamètre de 150 nm. Des vésicules à simple membrane (SMV) et des vésicules à membranes multiples (MMV) ont également été décrites (107). Toutes les protéines virales nécessaires à la réplication (soit NS3-NS5B) et l'ARN double-brin colocalisent au niveau des DMV (207). La plupart des DMV sont fermées, mais certaines possèdent un pore ouvert sur le cytoplasme de la cellule-hôte. Il n'a pas encore été clairement établi si la réplication advient à l'intérieur ou à l'extérieur des DMV, mais il est généralement admis que la réplication serait plutôt interne. Le recrutement de protéines cellulaires impliquées dans le transport nucléocytoplasmique tend à consolider cette hypothèse, qui justifierait le besoin de tels transporteurs (131). La formation de complexes de réplication séparés du reste du cytoplasme est un mécanisme commun à de très nombreux virus, cela peut s'expliquer par les avantages conférés par la compartimentation. D'abord, la formation d'un organite dédié à la réplication virale (RO pour *replication organelle*) permet de concentrer au même endroit tous les facteurs viraux et cellulaires nécessaires à la réplication et d'assurer la réplication spécifique de l'ARN viral en écartant les ARN cellulaires. Cela permet aussi de séparer nettement les différentes étapes du cycle viral et de gagner en efficacité en limitant la compétition entre les étapes nécessitant l'ARN viral : réplication, traduction et assemblage (131). Par ailleurs, le fait d'isoler le complexe de réplication au sein de ROs permettrait de le protéger des protéases et nucléases cellulaires, ainsi que d'éviter la détection des intermédiaires de réplication (ARN double-brin) par les récepteurs cellulaires de l'immunité innée antivirale tels que RIG-I et MDA5 (208). En effet, il a été démontré que les protéases et nucléases cellulaires ainsi que RIG-I et MDA5 avaient un accès restreints aux ROs dans les cellules infectées par HCV (131) (209).

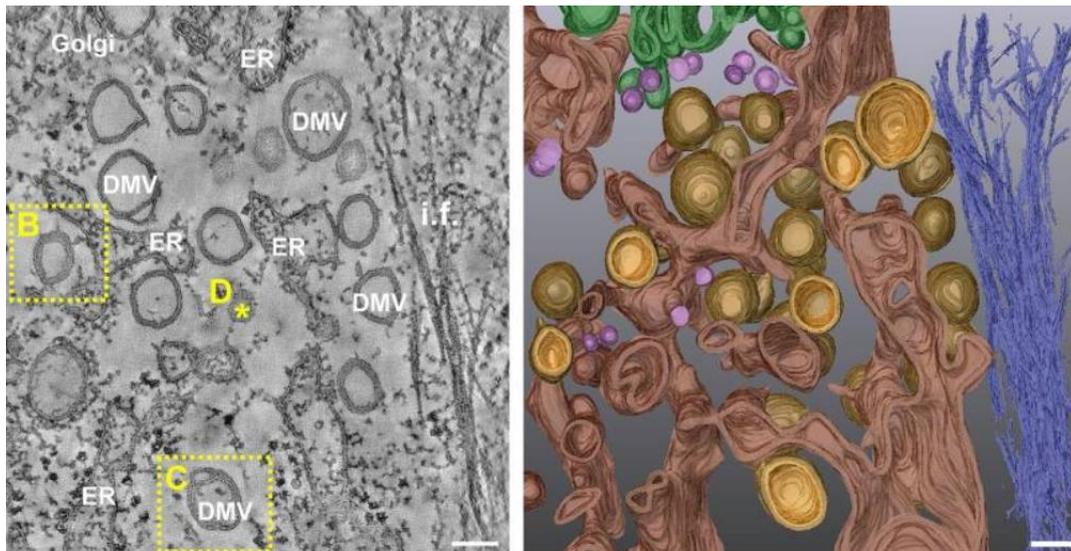


Figure 24 : structure des remaniements membranaires induits par HCV (tiré de (107)). Des cellules Huh7.5 ont été infectées avec la souche Jc1 et fixées à 16hpi avant d'être imagées au microscope électronique. Sur le panel de gauche, les DMV et le RE sont indiqués. Le panel de droite correspond à une représentation 3D de l'image obtenue par microscopie électronique. Le RE est représenté en marron, la membrane interne des DMV en jaune et leur membrane externe en marron, les SMV en rose, l'appareil de Golgi en vert et les filaments intermédiaires en bleu.

Le mécanisme de réplication d'HCV est complexe et nécessite, en plus des protéines virales, le recrutement de nombreux facteurs cellulaires. Tout d'abord, les remaniements membranaires induits par NS4B sont rendus possibles par le recrutement des protéines Surf4 (210) et PREB (*prolactin regulatory element binding*) (211), tandis que la formation des DMV nécessite l'interaction de CypA et RACK1 (*receptor for activated protein C kinase 1*) avec NS5A (212,213).

L'autophagie joue également un rôle important dans l'établissement de la réplication de nombreux virus, dont HCV. En effet, les DMV sont morphologiquement très proches des autophagosomes (214) et il a été démontré que la machinerie cellulaire de l'autophagie était nécessaire à l'initiation de la réplication d'HCV, mais dispensable une fois l'infection établie (215).

Par ailleurs, la réplication d'HCV est intimement liée au métabolisme des lipides. Avant tout, la création de réseaux membranaires étendus comme le sont les membranous webs requière une quantité importante de lipides. L'activité des complexes de réplication est donc associée à une augmentation de la lipogenèse, causée par l'interaction de NS4B avec les SREBPs, facteurs de transcription majeurs

des gènes impliqués dans la synthèse de lipides (216). HCV stimule la synthèse de cholestérol et d'acides gras, principalement les PUFA (*poly-unsaturated fatty acid*) et les VLCFA (*very long chain fatty acid*) par élongation des acides gras plus courts. Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibition des élongases ou des $\Delta 9$ désaturases inhibaient la réplication virale (217). L'environnement proche des complexes de réplication est également enrichi en PI4P (phosphatidyl inositol 4-phosphate) grâce au recrutement et à l'activation de la kinase PI4KIII α par NS5A et NS5B (218). La forte concentration en PI4P permet le recrutement de protéines impliquées dans le transport de lipides, ce qui assure l'approvisionnement des DMV en cholestérol, céramides et glycosphingolipides (131). Les DMV sont d'ailleurs associées à des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides, qui les protégeraient des RNases et protéases cellulaires (219).

De nombreux facteurs cellulaires favorisent la réplication efficace du génome viral. Plusieurs protéines cellulaires, comme par exemple La (La autoantigen), PTB (*polypyrimidine tract binding protein*) ou la *RNA-binding protein 24*, favorisent la circularisation de l'ARN viral, ce qui améliore son efficacité de réplication (131). D'autres protéines interagissent directement avec des protéines virales. Par exemple, plusieurs protéines comme VAPB-MSP (220) et FAS (fatty acid synthase) (221) interagissent directement avec la polymérase NS5B et modulent son activité. De même, NS3 et NS5A interagissent avec une pléthore de cofacteurs cellulaires. NS5A interagit notamment avec VAP-A et VAP-B, deux protéines de la membrane du RE nécessaires à la formation des complexes de réplication (222,223).

Enfin, la réplication d'HCV est régulée par de nombreux microRNA (miRNA). Tandis que la plupart des miRNA inhibent la réplication du génome viral (miR199a, miR351, miR196, etc), miR122 agit quant à lui comme un cofacteur pro-réplication (224). miR122 est le miRNA le plus abondant dans le foie, il représente à lui seul 60 à 70% de tous les miRNA présents dans les hépatocytes (225). miR122 interagit directement avec deux sites présents sur l'extrémité 5' UTR du génome viral, ce qui a pour effet de stimuler sa traduction, favoriser l'initiation de sa réplication et stabiliser le brin d'ARN en le protégeant de la dégradation par des exoribonucléases (224).

c) Assemblage et sortie des virions

Une fois les protéines virales produites et l'ARN répliqué, les nouveaux virions sont assemblés. Comme décrit précédemment, une particule infectieuse se compose d'un brin d'ARN encapsidé par la protéine core et entouré d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe E1 et E2, ainsi que des lipoprotéines cellulaires comme ApoE. L'assemblage consiste donc en une succession d'étapes permettant la formation de la capsidie contenant le génome, la formation de l'enveloppe et la sortie des LVPs de la cellule-hôte.

Dans un premier temps, core interagit avec les membranes via deux hélices amphipatiques situées dans son domaine D2 ainsi qu'un site de palmitoylation (cystéine conservée), ce qui lui permet une fois mature de migrer à la surface des gouttelettes lipidiques (226). Cette translocation est régulée par la phospholipase A2 (227) et DGAT1 (diacylglycerol acyltransférase 1) (228). Des mutations de core impactant son adressage aux LDs diminue drastiquement la production de particules infectieuses, la localisation de core à la surface des LDs est donc cruciale pour l'assemblage (229–231), mais transitoire. Core est ensuite retransloquée à la surface du RE par le facteur cellulaire AP2M1 (*adaptor-related protein complex 2 subunit mu 1*) (232). Il a par ailleurs été démontré qu'une interaction NS2-NS3/4a était impliquée dans la relocalisation de core au niveau des sites de bourgeonnement (233). La proximité entre les LDs, les DMV et ces sites de bourgeonnement favorise l'assemblage. En effet, des images de microscopie électronique récentes ont montré des LDs enroulées dans du RE à proximité des DMV (234).

L'ARN génomique doit ensuite être acheminé des complexes de réplication vers les sites d'assemblage, c'est le rôle des protéines NS5A et NS3-4A : le facteur cellulaire TIP47 interagit avec NS5A et recrute le complexe NS5A-ARN à proximité des sites d'assemblage, à l'interface entre les LDs et la membrane externe du RE (Figure 25) (141). Cependant, selon Miyanari et al., c'est core qui recruterait les complexes de réplication à proximité des LDs par interaction avec NS5A (230). Le mécanisme d'encapsidation du génome en lui-même est encore mal connu, mais nous savons que core interagit avec l'ARN d'HCV via son domaine D1.

Les protéines d'enveloppe doivent aussi s'accumuler au niveau des sites de bourgeonnement. Après leur synthèse, E1 et E2 sont adressées au RE, où elles

s'assemblent pour former des hétérodimères non-covalents (235). C'est un processus lent et complexe car chaque protéine participe à la conformation de l'autre, en interaction avec des chaperonnes cellulaires comme la calnexine (236). Des expériences de coimmunoprécipitation et des analyses génétiques suggèrent que NS2 interagit avec E2 et permet le recrutement du dimère E1-E2 sur les sites d'assemblage (237,238). La protéine p7 semble également impliquée dans le recrutement des protéines d'enveloppe (239).

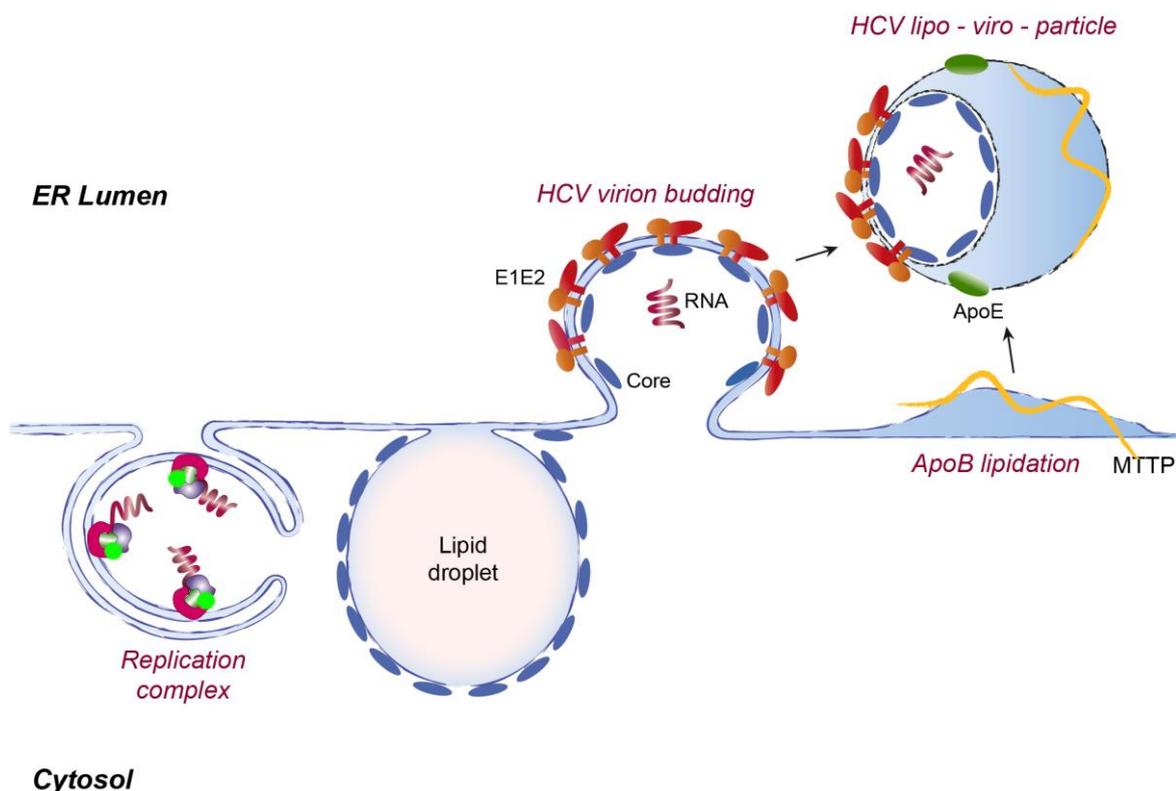


Figure 25 : schéma du bourgeonnement des LVP dans la lumière du RE (tiré de (144)).

Le mécanisme exact d'enveloppement des capsides contenant l'ARN n'est pas non plus élucidé. L'assemblage des particules virales est décrit par certaines études comme étant similaire à celui des VLDL (240). Il serait ainsi régulé par la machinerie cellulaire de formation des VLDL, comme MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), dont l'inhibition entraîne le blocage de la production de particules virales (241). Cependant, la production de LVP indépendamment de la sécrétion de VLDL a été observée dans des cellules non-hépatiques. L'expression exogène des facteurs cellulaires nécessaires au cycle de vie d'HCV dans des cellules HeLa et 293 a permis l'entrée et la réplication d'HCV, mais pas la production de LVPs en l'absence d'ApoE,

dont l'expression ectopique a permis de restaurer l'étape d'assemblage. Les cellules HeLa et 293 ne sécrétant pas de VLDL, ces études tendent à démontrer que la sécrétion des LVPs ne dépendrait pas de la sécrétion des VLDL médiée par MTTP et ApoB, mais bien uniquement d'ApoE (141). Des résultats opposés ont cependant été obtenus dans des cellules Huh7, où le knock-out d'ApoB réduit la production de particule virale à moins d'un dixième de la production observée dans les cellules contrôles (242). Le rôle d'ApoE, bien que prépondérant, n'est pas non plus clairement expliqué. Il a été démontré qu'ApoE interagit avec E1-E2 dans le RE (243), ce qui suggère un rôle d'ApoE dès l'initiation de l'assemblage, mais son knock-out n'empêche ni la formation de nucléocapsides ni le bourgeonnement de particules enveloppées dans la lumière du RE (244).

Les particules enveloppées ayant bourgeonné dans la lumière du RE rejoignent ensuite l'appareil de Golgi, plus spécifiquement le TGN (*trans-Golgi network*), où elles seraient sécrétées en suivant la voie endosomale.

4) Avancées dans la lutte contre le virus

a) Dépistage de l'hépatite C

Le dépistage de l'hépatite C est un enjeu majeur dans la lutte contre la pandémie. En effet, les premières années, voire les premières décennies d'infection chronique par HCV sont souvent asymptomatiques, ce qui provoque fréquemment un diagnostic tardif et donc une mauvaise prise en charge. On estime que 80% des patients HCV-positifs ignorent leur statut faute de dépistage et participent potentiellement à la diffusion du virus sans en avoir conscience, c'est pourquoi l'OMS soutient de nombreuses campagnes nationales et internationales de dépistage de l'hépatite C. Un dépistage plus précoce permettrait une meilleure prise en charge de la maladie (via un meilleur accès aux traitements disponibles) et limiterait les nouvelles contaminations.

Le dépistage se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps, un test sérologique visant à détecter les anticorps anti-HCV totaux est réalisé. Ces anticorps apparaissent 60 à 70 jours après exposition et sont le signe d'un contact passé ou

présent avec le virus. A ce stade, il est impossible de savoir si l'infection a été spontanément éliminée ou si elle est encore active, il faut donc réaliser des tests d'amplification des acides nucléiques (TAN) visant à amplifier et quantifier en temps réel l'ARN viral. Le seuil de détection de ce test est de 10-15 UI/mL. Si le test s'avère positif, un second test est réalisé à 6 mois d'intervalle pour déterminer la chronicité ou non de l'infection. Si les deux tests sont positifs, l'hépatite est considérée comme chronique.

Il faut ensuite diagnostiquer l'avancement de la maladie en évaluant le degré d'atteinte hépatique. Des études histologiques du foie sont alors réalisées, anciennement via une biopsie, méthode de référence jugée trop invasive et remplacée actuellement par la combinaison d'un test d'élastométrie hépatique (FibroScan®) et de tests sanguins (FibroTest®, FibroMètre®, APRI (*aspartate transaminase to platelets ratio index*), ALBI (albumine-bilirubine). Le FibroTest® prend en compte l'âge et le sexe du patient, ainsi que le dosage sanguin de 5 marqueurs indirects de la fibrose : l'haptoglobine, l'alpha 2-macroglobuline, l'apolipoprotéine A1, la bilirubine et l'activité des gamma-glutamyl transférases (245) ; tandis que le FibroMètre® prend en compte l'âge du patient ainsi que le dosage de 3 marqueurs : l'alpha 2-macroglobuline, l'acide hyaluronique et le taux de prothrombine (246). Les méthodes non-invasives utilisées aujourd'hui ont prouvé leur fiabilité par comparaison de leurs résultats avec le résultat de biopsies, les scores obtenus sont similaires d'une technique à l'autre. Depuis 1996, on utilise le score METAVIR pour évaluer la sévérité de l'atteinte hépatique. Le score METAVIR permet d'évaluer séparément la nécrose et l'inflammation du foie d'un côté (soit l'activité histologique, notée A), l'apparition de fibrose hépatique de l'autre (notée F). L'évaluation de l'activité histologique prend en compte la nécrose globulaire focale, l'inflammation portale, la nécrose fragmentaire (soit la nécrose périportale) et la nécrose de pontage. Selon le niveau d'inflammation et de nécrose, on obtient un score allant de A0 (pas d'activité histologique) à A3 (activité histologique sévère). La fibrose est évaluée avec un score allant de F0 à F4, correspondant à F0 (pas de fibrose), F1 (fibrose portale sans septa), F2 (fibrose portale avec de rares septa), F3 (de nombreux septa sans cirrhose), F4 (cirrhose) (247).

b) Traitement de l'hépatite C

Il y a encore peu de temps, aucun traitement spécifique contre l'hépatite C n'avait été découvert. Le seul traitement recommandé jusqu'en 2011 était constitué de l'association d'interféron pégylé et de ribavirine. C'était un traitement long (24 à 48 semaines selon le génotype), à l'efficacité limitée (40 à 80% selon le génotype) et aux nombreux effets secondaires (syndrome grippal, asthénie, leucopénie, thrombopénie, anémie, troubles de l'humeur, dépression...). En 2011, l'ajout de Telaprevir ou de Boceprevir (anti-NS3/4A) au traitement interféron + ribavirine constitua une première amélioration notable en termes de résultats (75-80% d'efficacité contre le génotype 1, 35% d'efficacité chez les patients insensibles au premier traitement), cependant ces tri-thérapies restaient très mal supportées (248).

La caractérisation des protéines non-structurales de HCV et de leurs fonctions ont permis de mettre au point une nouvelle génération d'antiviraux spécifiques, arrivés sur le marché en 2014. Ces nouvelles molécules, mise sur le marché depuis 2011 sont appelées les antiviraux à action directe (AAD). Les AAD, efficaces dans 95% des cas, bloquent certaines des étapes clés du cycle de réplication du virus. Il en existe trois types, selon la protéine virale qu'ils ciblent : les inhibiteurs de la protéase NS3/4A (PIs), de NS5A et de la polymérase NS5B. Les anti-NS5B sont divisés entre inhibiteurs nucléosidique/nucléotidique et inhibiteurs non-nucléos(t)idiques (249).

Inhibiteurs de NS3/4A

La protéine NS3/4A est une protéase dont le rôle principal est de cliver la polyprotéine virale au niveau de quatre sites de clivage, permettant ainsi l'action des autres protéines une fois séparées les unes des autres. Les inhibiteurs de protéase de première génération (Telaprevir, Boceprevir) nécessitaient toujours l'administration conjointe d'interféron et de ribavirine. Ils étaient spécifiques du génotype 1 et étaient accompagnés de nombreux effets secondaires. Ces inhibiteurs de protéases sont aujourd'hui remplacés par la deuxième génération de PIs (Simeprevir, Paritaprevir, Grazoprevir, Glecaprevir, Vaxilaprevir), qui présentent une plus grande barrière au développement de résistance virale, une large couverture génotypique et une meilleure pharmacocinétique. Ces molécules sont désignées par le suffixe « -previr » (250).

Inhibiteurs de NS5A

La protéine NS5A n'a pas d'activité enzymatique propre mais est essentielle à la formation des complexes de réplication et à l'assemblage de nouvelles particules virales. Les inhibiteurs de NS5A, désignés par le suffixe « -asvir », ont un pouvoir antiviral fort et sont efficaces sur la plupart des génotypes d'HCV, mais leur robustesse face à l'apparition de résistances est assez limitée. Les premiers inhibiteurs de NS5A (Ledipasvir, Omitasvir, Elbasvir) ont été remplacés par une deuxième génération de traitements, efficaces sur tous les génotypes (Velpatasvir, Pibrentasvir) dans les pays occidentaux (249).

Inhibiteurs de NS5B

NS5B peut être inhibée par deux types de drogues, les inhibiteurs nucléos(t)idique (NIs) et inhibiteurs non-nucléos(t)idiques (NNIs), tous les deux désignés par le suffixe « -buvir ». Les NIs agissent en se substituant au substrat de NS5B, causant des aberrations dans l'ARN viral néoformé. Ils ont une action pan-génotypique, un fort pouvoir antiviral et sont très robustes à l'apparition de résistance. Le Sofosbuvir est le principal inhibiteur nucléos(t)idique utilisé à ce jour, mais d'autres drogues comme MIV-802 sont aujourd'hui en phase de test clinique. Le principe des NNIs est sensiblement différent, ils agissent comme des inhibiteurs allostériques en se fixant sur quatre sites de NS5B, ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine et inhibe son activité polymérase. Les NNIs sont globalement moins efficaces que le Sofosbuvir mais s'avèrent utiles pour traiter certaines souches résistantes. Le seul inhibiteur non-nucléos(t)idique autorisé à ce jour est le Dasabuvir, qui est notamment indiqué en combinaison avec Paritaprevir et Ombitasvir contre certaines souches de génotype 1.

Les traitements actuels s'étendent sur une durée de 8 à 12 semaines avec une efficacité de 95% tous génotypes confondus (Figure 26). Ils apportent également une solution thérapeutique aux patients ayant des contre-indications à l'usage d'interféron, comme les malades présentant une cirrhose décompensée (251). La disparition dans la plupart des protocoles de soin de l'interféron et de la ribavirine permet également une bien meilleure tolérance thérapeutique par les patients grâce à la diminution des

effets secondaires, qui se limitent maintenant à de la fatigue, des nausées, une légère photosensibilité et des maux de tête modérés. Une personne est considérée guérie si aucun ARN d'HCV n'est détectable 12 semaines après la fin du traitement antiviral, c'est ce qu'on appelle la SVR12 (*Sustained Virological Response at week 12*) (249). Passé ce délai, le risque d'un retour tardif du virus est inférieur à 0,2% et a plus de chances d'être le signe d'une nouvelle infection plutôt qu'un regain de la première (252), l'infection par HCV n'étant pas immunisante (253). On observe cependant de meilleurs taux de guérison spontanée de l'hépatite C aiguë en cas réinfection qu'en primo-infection (254).

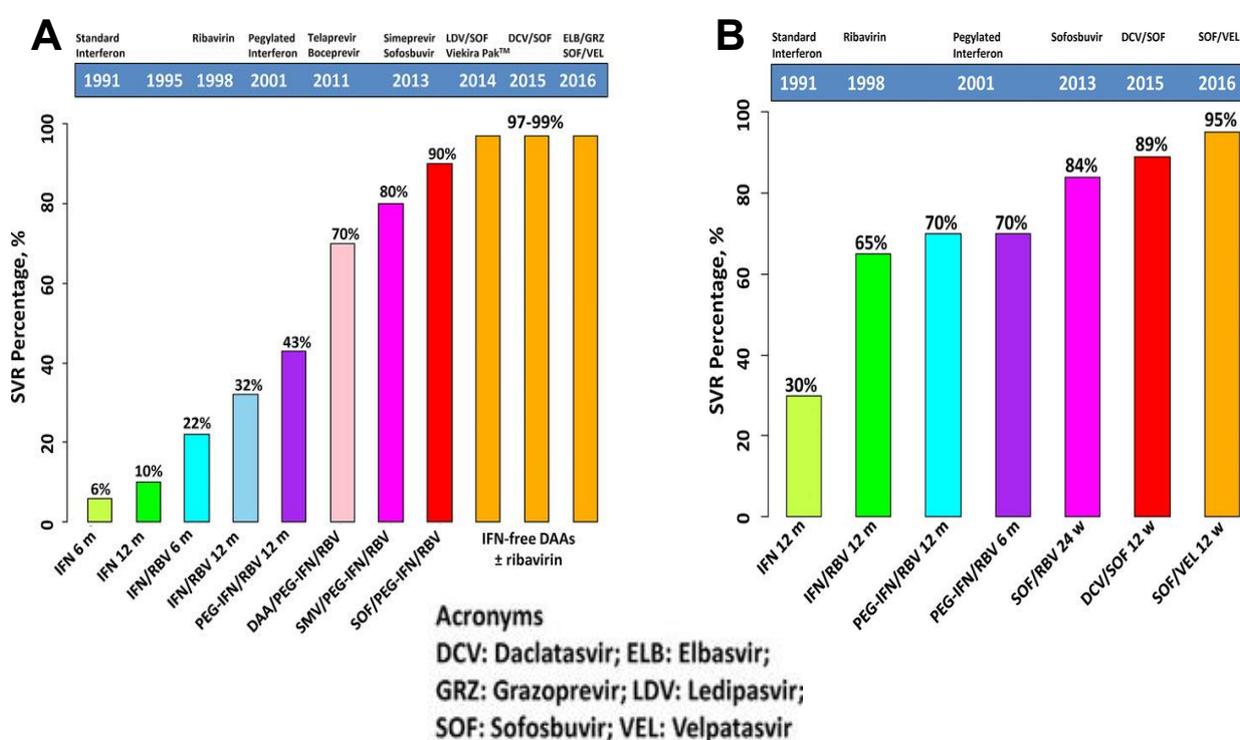


Figure 26 : évolution de l'efficacité des traitements contre l'hépatite C de 1991 à 2016 (adapté de (251)). Les résultats ainsi que les protocoles de soin sont présentés pour les génotypes 1 (A) et 3 (B).

En France, un parcours de soins simplifié permet aux patients ne présentant pas de comorbidités ou d'affection hépatique sévère d'être suivis par leur médecin généraliste. Les patients présentant des comorbidités ou une cirrhose décompensée (classe B ou C de la classification de Child-Pugh) nécessitent quant à eux la convocation de réunions de concertation pluridisciplinaire, ce qui entraîne un suivi plus contraignant. Les différents protocoles de soin et leur indication sont répertoriés dans

le Tableau 2. Les patients atteignant la SVR12 après un traitement aux AAD conservent un suivi médical en fonction du degré de sévérité de leur atteinte hépatique : en cas de cirrhose décompensée, un dépistage semestriel du cancer du foie est fortement conseillé. Les patients co-infectés avec HBV ou HIV nécessitent également un suivi plus poussé, de même que les patients consommateurs de drogues injectables. Dans tous les cas, une formation de sensibilisation aux risques de réinfection est prodiguée (255,256).

Molécules	Génotypes	Durée	Efficacité	Contre-indications
Glecaprevir + Pibrentasvir	Tous	8-12 semaines 16 si génotype 3	95%	Cirrhose décompensée (classe B ou C)
Sofosbuvir + Velpatasvir	Tous	12 semaines	95%	Cirrhose décompensée (classe C) sauf si ajout de ribavirine
Sofosbuvir + Ledipasvir + Ribavirine	GT1	8 semaines	95%	Atteinte hépatique sévère
Grazoprevir + Elbasvir	GT1a GT1b GT4	12 semaines	95%	GT1a présentant une charge virale élevée GT4 si échec d'un précédent traitement combinant interféron et ribavirine

Tableau 2 : protocoles de soin pour traiter l'hépatite C en France ((255) (256)). GT = génotype

c) Perspectives vaccinales

La mise au point d'un vaccin anti-HCV est devenue une priorité dès la découverte du virus et de sa prévalence mondiale, et l'est toujours aujourd'hui malgré l'existence des AAD. Comme vu précédemment, la majorité des porteurs du virus ignorent leur statut faute de dépistage. Dans ce contexte, l'élaboration d'un vaccin permettrait une lutte efficace contre l'hépatite C, en particulier dans les pays en voie de développement n'ayant pas forcément accès aux traitements modernes pour des raisons de coût, ou pour les populations marginalisées des pays développés. Les consommateurs de drogues injectables sont particulièrement à risque d'une infection par HCV, mais aussi d'une réinfection de novo une fois guéris de la première si les

pratiques à risques persistent ; la vaccination de ces populations permettrait de prévenir de potentielles infections et réinfections. Enfin, il serait intéressant de vacciner le personnel soignant soumis à des risques d'exposition à du sang potentiellement contaminé.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun vaccin contre l'hépatite C n'a été mis au point, malgré les enjeux liés à sa découverte. Ce manque de résultat peut en partie s'expliquer par la diversité génétique d'HCV. Comme indiqué plus tôt, on dénombre aujourd'hui 8 génotypes différents, présentant environ 30% de variation génétique, auxquels doivent s'ajouter de nombreux sous-génotypes. Une grande partie de cette variété génétique concerne les glycoprotéines d'enveloppe du virus, celles-là même que ciblent les anticorps de l'hôte. S'y ajoute en plus une grande variabilité intra-génotypique, le génome d'HCV mutant très rapidement à cause du fort taux d'erreurs de la polymérase virale. Ces nombreuses mutations aléatoires participent à l'échappement du virus à la réponse immunitaire, y compris celle induite par un potentiel candidat-vaccin (254). De plus, l'exposition à HCV n'est pas immunisante, puisque des cas de réinfection après une première guérison ont été observés, y compris avec la même souche virale (257).

Une autre difficulté empêchant jusqu'ici la découverte d'un vaccin est l'échappement immunitaire des virions. En effet, HCV utilise plusieurs mécanismes de défense contre les anticorps neutralisants, qui rendent difficile la mise au point d'un vaccin. D'abord, E1 et E2, les protéines d'enveloppe d'HCV (qui sont sensibles aux anticorps neutralisants et sont la cible de la plupart des candidat-vaccins) possèdent des régions hypervariables, notamment la région HVR1 (hypervariable region 1, présente sur E2), une région immunodominante qui semble protéger d'autres sites plus conservés de E2 des anticorps neutralisants. Les épitopes des protéines d'enveloppe sont également masqués par de nombreuses glycosylations, qui créent comme un bouclier de glycanes autour des épitopes et diminuent l'efficacité des anticorps neutralisants. Ce procédé est utilisé par d'autres virus comme HIV ou le virus de la grippe. E1 et E2 présentent respectivement 4 et 11 sites de N-glycosylation très conservés dont la suppression augmente la sensibilité des particules virales aux anticorps neutralisants (258). Par ailleurs, il a été démontré que le polymorphisme naturellement présent au niveau de l'enveloppe d'HCV influençait la sensibilité des virions aux anticorps neutralisants (259), sensibilité qui augmente avec la température

(260). Augestad *et al.* suggèrent que le complexe E1-E2 pourrait se présenter sous deux formes, « ouverte » (sensible aux anticorps neutralisants) et « fermée » (moins sensible), à la manière des changements dynamiques observés au niveau de la protéine E des flavivirus (261).

Les mécanismes mis en place par HCV pour échapper aux anticorps neutralisants étant nombreux et efficaces, la plupart des recherches se concentrent sur l'élaboration d'un vaccin basé sur la réponse cellulaire des lymphocytes T. Certains candidats-vaccins, basés sur la réponse cellulaire T et ciblant les protéines non-structurales d'HCV, ont notamment montré des résultats très prometteurs sur le modèle chimpanzé, mais se sont révélés décevants durant les essais cliniques (262) (263).

C- Pathogenèse au niveau cellulaire

Le virus de l'hépatite C cause des dysfonctionnements importants dans les cellules qu'il infecte, il impacte de nombreux aspects du métabolisme cellulaire et induit des altérations morphologiques de plusieurs organelles, souvent corrélées à une perte partielle de leur fonction. L'altération de la morphologie de certains compartiments cellulaires est irréversible même plusieurs années post-traitement chez les patients ayant atteint la SVR ; c'est le cas des noyaux, des mitochondries, des gouttelettes lipidiques et du réticulum endoplasmique (Figure 27). Aoyagi *et al* ont observé que les altérations morphologiques constatées chez les patients avaient certes tendance à s'améliorer avec le traitement (sans retour à la normale), mais réapparaissaient avec le temps, ce qui pourrait contribuer à expliquer le risque augmenté de HCC chez les patients anciennement chroniquement infectés par HCV mais ayant atteint la SVR (264).

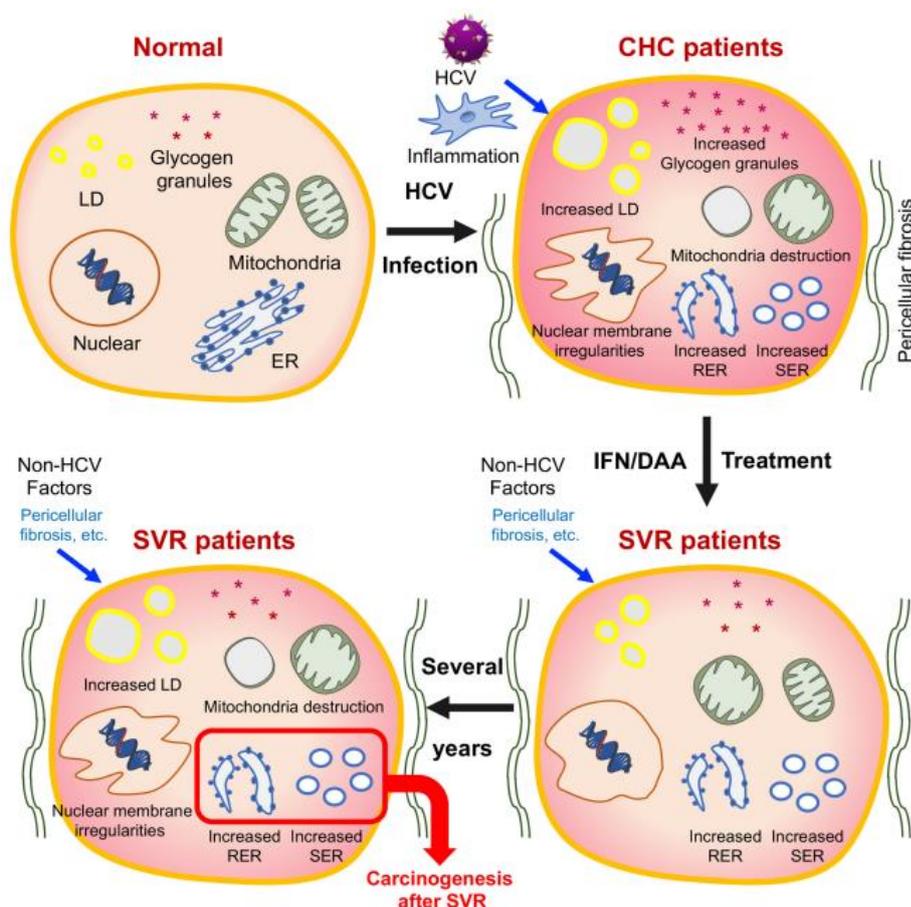


Figure 27 : Schéma des altérations cellulaires présentes dans les hépatocytes des patients étant ou ayant été chroniquement infectés par HCV (tiré de (264)).

1) Impact d'HCV sur la morphologie des organelles

Le RE est très fortement altéré par le cycle viral d'HCV. En effet, comme décrit précédemment, le virus induit des remaniements importants de la membrane du RE lors des étapes de réplication et d'assemblage (Figure 24). En plus de la formation de membranous web et de DMVs, le RE des cellules infectées est dilaté et dégranulé de façon parfois irréversible dans les hépatocytes des patients chroniquement infectés par HCV, même après traitement avec des AAD (264) .

La morphologie du noyau et des gouttelettes lipidiques des cellules infectées est également altérée. On observe en effet dans les biopsies de patients chroniquement infectés par HCV des gouttelettes lipidiques élargies ainsi que des noyaux déformés, avec une membrane nucléaire non-lisse et une augmentation du nombre de pores nucléaires. Ces altérations sont partiellement irréversibles puisqu'on les observe encore dans une moindre mesure dans les biopsies des patients ayant atteint la SVR (264).

Les mitochondries sont elles aussi fortement impactées par l'infection. HCV induit en effet un élargissement des mitochondries, parfois associé à une disparition des crêtes mitochondriales voire de la membrane interne entière. L'allongement des mitochondries associé à l'apparition d'inclusions paracrystallines est également documenté (264). De même, leur localisation subcellulaire est modifiée par HCV : l'accumulation des mitochondries autour du noyau des cellules infectées a été observée (265). Enfin, on remarque une diminution du ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire dans les hépatocytes des patients chroniquement infectés, particulièrement par le génotype 1B (266).

2) Altération du métabolisme cellulaire

a) Induction de l'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique de recyclage cellulaire qui permet à la cellule de conserver son homéostasie en dégradant les protéines et organelles endommagées. L'autophagie peut être induite par de nombreux stimuli comme la carence en nutriments, le stress oxydatif, le stress réticulaire ou une infection. Elle débute par la formation de phagophores dans le cytoplasme, qui s'étendent et se referment autour des organelles ou protéines cibles pour devenir des autophagosomes. La fusion entre autophagosome et lysosome permet ensuite la dégradation des organelles ou protéines présentes à l'intérieur de l'autolysosome (267).

HCV induit l'autophagie dans les cellules infectées (268) de plusieurs manières (Figure 28). D'abord indirectement, en activant partiellement la réponse UPR suite au stress réticulaire généré par l'infection (269) ou via l'augmentation des ROS dans les cellules infectées. Un taux élevé de ROS provoque la phosphorylation de p62, ce qui initie l'autophagie (270). HCV induit aussi l'autophagie de manière directe. NS3-4A interagit avec IRGM (*immunity-related GTPase family M protein*), qui elle-même interagit avec des protéines de l'autophagie comme ATG5 ou ATG10 et déclenche la machinerie d'autophagie (271). NS4B interagit avec le complexe Rab5, hVPS34 et Beclin-1, trois protéines de l'autophagie (272), mais l'impact de ces interactions n'est pas encore très bien élucidé. Par ailleurs, NS4B régulerait l'autophagie temporellement en activant d'abord Rubicon (*run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich domain-containing protein*), qui inhibe la maturation des autophagosomes et provoque l'accumulation de leur forme précoce, puis UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*), qui au contraire stimule la maturation des autophagosomes et a un effet négatif sur la réplication d'HCV (273).

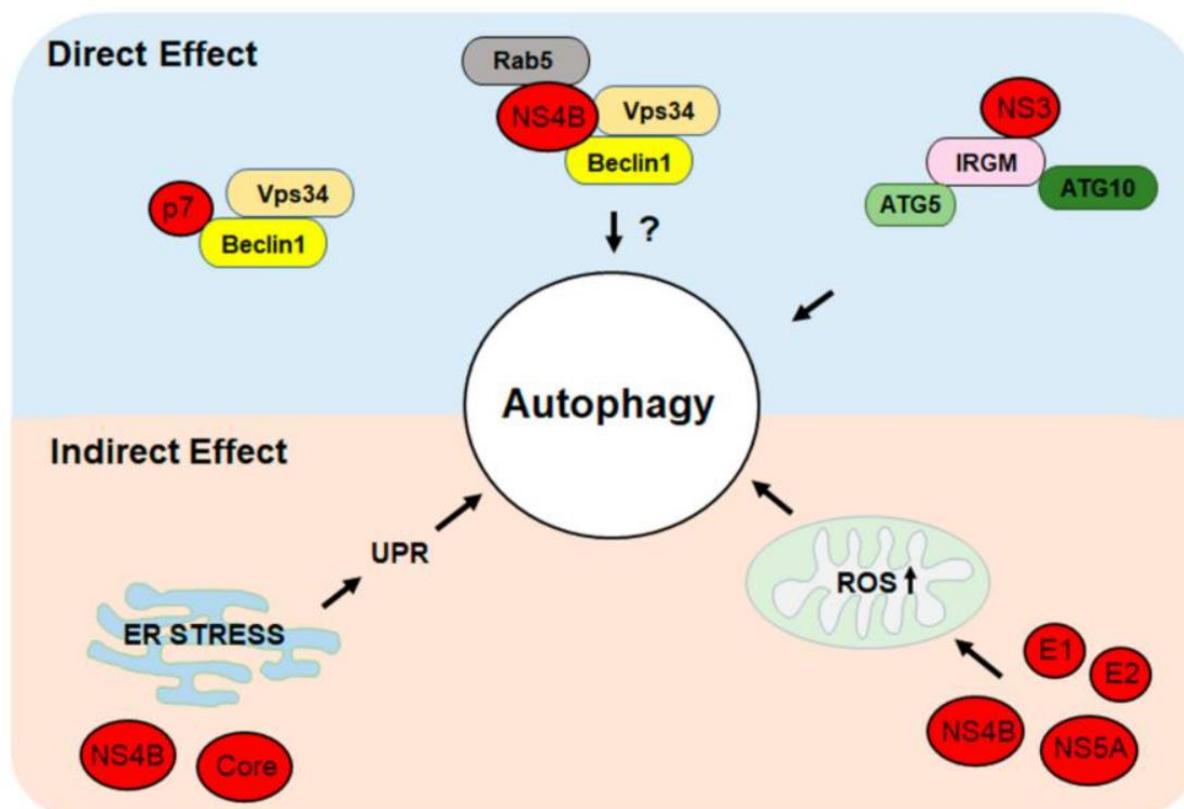


Figure 28 : voies d'induction de l'autophagie par HCV (tiré de (267)). HCV induit l'autophagie de manière indirecte, via le stress oxydatif et le stress réticulaire qu'il génère, et par interaction directe de NS3 et NS4B avec des protéines de l'autophagie.

b) Altération du métabolisme des lipides

Le cycle cellulaire du virus de l'hépatite C est intimement lié au métabolisme des lipides. Comme décrit précédemment, HCV augmente la synthèse d'acides gras en clivant SREBP (108) et perturbe l'homéostasie des lipoprotéines en détournant la machinerie d'export des LDL, ce qui cause une hypocholestérolémie et une hypolipoprotéïnémie. Ces perturbations métaboliques sont réversibles grâce aux AAD, mais les patients présentent parfois une hypercholestérolémie de rebond, surtout lorsqu'ils sont infectés par le génotype 3 (274).

La perturbation de la machinerie d'export des LDL provoque aussi l'accumulation de lipides dans les LDs des hépatocytes, c'est la principale cause de l'apparition de stéatose hépatique (274,275). Selon le génotype considéré, 40 à 85% des patients chroniquement infectés par HCV présentent une stéatose hépatique, contre 20 à 30% de la population générale et 19 à 50% des patients diagnostiqués avec une autre maladie hépatique chronique (HBV inclus). La prévalence et la sévérité

de la stéatose sont plus importantes parmi les patients infectés par le génotype 3 (276). La stéatose hépatique HCV-induite est classée en deux types : la stéatose métabolique, associée à l'apparition d'une résistance à l'insuline et d'un syndrome métabolique, caractéristique des patients infectés par un génotype autre que le génotype 3 ; et la stéatose virale, spécifique au génotype 3 et corrélée à la charge virale et à l'hypolipidémie des patients (276), plus fréquente et souvent plus sévère. Le développement d'une stéatose hépatique est par ailleurs corrélé à une augmentation du risque de développer un cancer du foie (277).

L'infection par HCV altère également le fonctionnement des mitochondries et cause une inhibition de la β -oxydation des acides gras en diminuant l'expression de la MTP (*mitochondrial trifunctional protein*) (278).

c) *Perturbation du réticulum endoplasmique et stress réticulaire*

L'infection par HCV induit un stress important du RE. Ce stress s'explique par les remaniements membranaires induits par le virus et par la quantité de protéines virales présentes dans le RE. En réponse à ce stress, les cellules infectées déclenchent la réponse UPR. C'est un mécanisme physiologique visant à induire via des facteurs de transcription l'expression de gènes permettant d'augmenter les capacités de maturation, de *fold*ing et de dégradation des protéines dans le RE, ce qui restaure l'homéostasie de la cellule et permet sa survie (Figure 29) (279). La réponse UPR repose sur trois bras d'induction, les protéines transmembranaires IRE α (*inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 α (*activated transcription factor 6 α*), activées par l'accumulation de protéines immatures dans le RE. IRE α cause l'excision du mRNA XBP1 en sXBP1 (*spliced XBP1*), un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes impliqués dans l'ERAD (*ER-associated degradation*) et la synthèse de protéines chaperonnes. PERK induit la phosphorylation de eIF2 α , ce qui augmente l'expression du facteur de transcription ATF4 et inhibe la synthèse de protéines. ATF6 α est transloqué dans l'appareil de Golgi, où il est clivé et devient lui-même un facteur de transcription induisant la synthèse de nouvelles protéines chaperonnes et l'expression d'autres gènes de la réponse UPR (279,280). HCV va certes déclencher la réponse UPR, mais cette réponse s'avère défectueuse dans les cellules infectées. Le virus inhibe l'activité du facteur de transcription XBP1, ce qui empêche l'induction de

l'expression de EDEM (*ER degradation enhancing mannosidase like protein*) et bloque ainsi un premier bras de la réponse UPR (281). Par ailleurs, E2 interagit avec PERK en tant que pseudo-substrat et empêche son interaction avec eIF2 α par compétition, ce qui bloque un second bras de la réponse UPR (282) et garantit la non-dégradation des protéines virales.

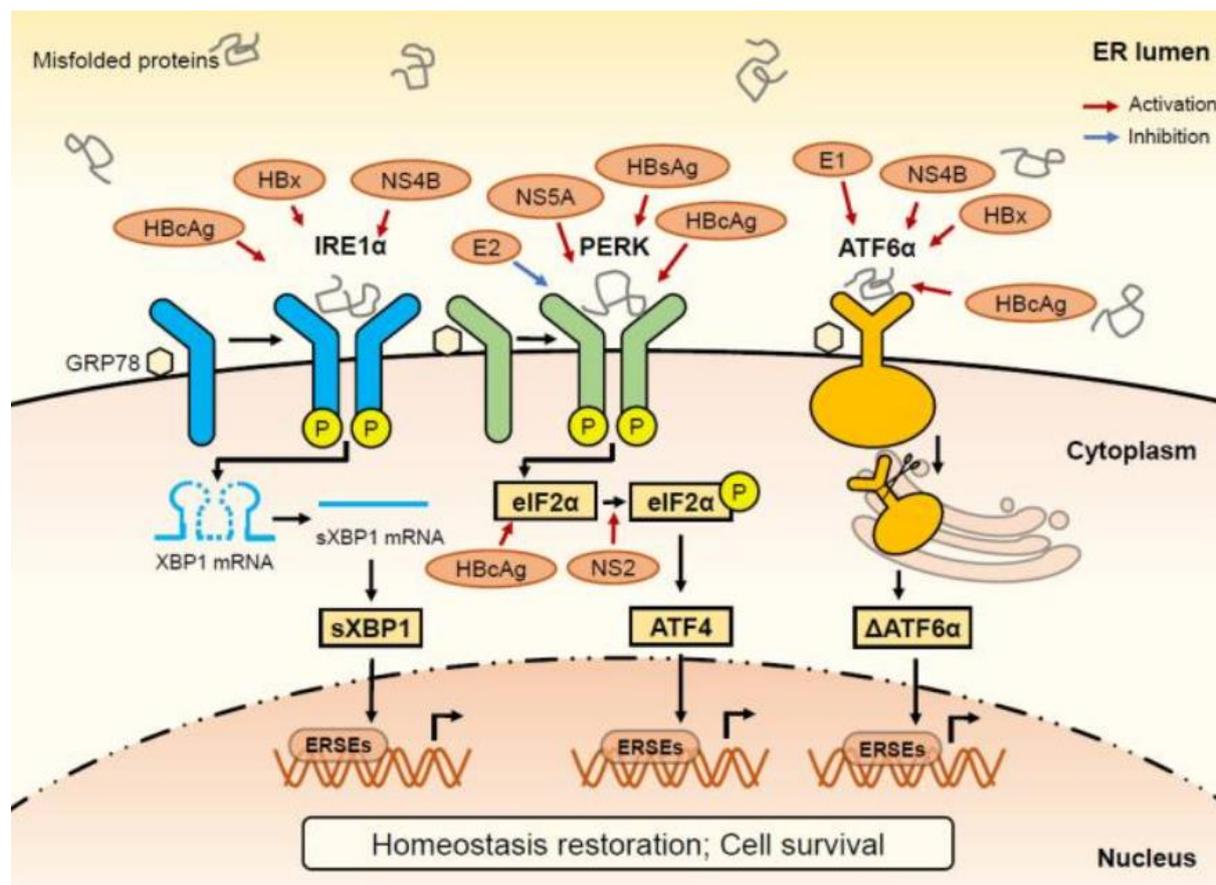


Figure 29 : la réponse UPR (tiré de (279)). Les trois bras d'induction de la réponse UPR sont représentés : IRE α (en bleu), PERK (en vert) et ATF6 α (en jaune).

d) *Perturbation des mitochondries et stress oxydatif*

HCV cause une augmentation importante du stress oxydatif dans les hépatocytes infectés. Bien que la plupart des protéines virales soient impliquées dans l'augmentation du taux de ROS intracellulaires, les protéines core et NS5A en sont les principaux effecteurs (283). Ces deux protéines ont notamment un fort impact sur la fonction des mitochondries. En effet, de nombreux virus oncogènes perturbent les mitochondries, le lien entre perturbation des fonctions mitochondriales, augmentation du stress oxydant et apparition de cancers est d'ailleurs bien établi (265). Dans le cas de l'hépatite C, la protéine core est partiellement localisée sur la membrane externe des mitochondries et au niveau des MAMs (*mitochondria-associated ER membranes*). Elle provoque un flux d'ions Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie, ce qui dépolarise la membrane mitochondriale interne et perturbe la chaîne de transport d'électrons, induisant par conséquent la fuite des électrons non-pris en charge, une augmentation de la synthèse d' H_2O_2 et la formation d'ions superoxyde O_2^- (284). Par ailleurs, le domaine 1 de NS5A induit l'expression de NOX1 et NOX4 (NADPH oxydase 1 et 4), deux enzymes mitochondriales productrices de ROS, par l'intermédiaire de TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*).

Le complexe NS3/4A a lui aussi un impact négatif sur les fonctions mitochondriales, bien qu'il n'induisse pas la production de ROS. Il clive la protéine MAVS présente à la surface des mitochondries. MAVS fait partie de la chaîne d'induction de l'interféron dans le contexte de l'immunité innée antivirale, son clivage permet à HCV d'échapper à la réponse antivirale innée et d'établir l'infection (100). Enfin, HCV inhibe l'expression de MTP, une enzyme clé de la β -oxydation des acides gras dans les mitochondries, ce qui participe à l'accumulation d'acides gras dans les cellules infectées en bloquant leur dégradation (278).

La perturbation des mitochondries n'est cependant pas la seule source de stress oxydatif en cas d'infection par HCV. NS5A induit l'expression de CYP2E1 (cytochrome P450 2E1), une protéine de la membrane du RE impliquée dans la détoxification et naturellement très exprimée dans le foie. CYP2E1 est alors sur-exprimée dans le foie des patients chroniquement infectés par HCV et son activité contribue à la génération de ROS (285,286). De même, HCV cause l'accumulation de fer dans le foie des patients chroniquement infectés en diminuant les taux d'hepcidine, un peptide connu pour agir négativement sur l'absorption du fer. Le fer présent dans

le foie va alors réagir avec l'H₂O₂ synthétisé en excès par les différents mécanismes décrits ci-dessus et former des ions superoxydes, ce qui contribue à augmenter le stress oxydatif : c'est la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$) (286,287). Enfin, les hépatocytes endommagés relâchent des ROS dans le milieu extracellulaire, ce qui active les cellules stellaires voisines. Ces cellules sécrétrices de collagène sont impliquées dans le phénomène de fibrogenèse, mais elles semblent être aussi une source de ROS supplémentaires lors de l'infection chronique (283). Les conséquences du stress oxydatif induit par HCV sont multiples, l'augmentation des ROS dans le foie des patients infectés contribue au maintien de l'inflammation chronique, à la fibrogenèse et à la carcinogenèse (283).

e) *Altération des fonctions peroxysomales*

Deux études récentes ont mis en évidence l'impact d'HCV sur la fonction des peroxysomes. En 2019, Lupberger *et al.* ont démontré que l'infection diminuait l'expression de onze gènes peroxysomiaux dans le foie des patients chroniquement infectés et dans des cellules Huh-7.5.1 différenciées par un traitement au DMSO. La down-régulation de ces onze gènes est corrélée à une diminution de la fonction peroxysomale, notamment concernant le métabolisme des lipides. En effet, une accumulation d'acides gras à très longue chaîne, spécifiquement dégradés par les peroxysomes, a été constatée dans les cellules infectées (288). Ces résultats ont été confirmés très récemment par une étude d'Ali *et al.* portant sur l'analyse d'échantillons de patients atteints d'hépatite C chronique (289). Par ailleurs, l'analyse de biopsies de patients chroniquement infectés par HCV a révélé une corrélation entre dégradation des fonctions peroxysomales et sévérité de l'atteinte hépatique (cirrhose plus avancée, apparition d'HCC, décès lié à l'hépatite C). Une fonction peroxysomale fortement dégradée serait donc un marqueur de mauvais pronostic clinique (288). La pathogenèse d'HCV en lien avec les peroxysomes est encore peu connue, mais des données générées par notre laboratoire suggèrent que l'impact de l'infection sur ces organites est plus important que ce que l'on imaginait jusqu'ici.

II- Peroxysomes

A- Nature et fonction des peroxysomes

1) Description des peroxysomes

Les peroxysomes sont de petits organites sphériques présents par centaines dans presque toutes les cellules eucaryotes. D'abord découverts par Johannes Rhodin en 1954 sous le nom de « microbodies », c'est en 1966 que Christian de Duve et Pierre Baudhuin parviennent à les caractériser et leur donnent leur nom définitif (290). Délimités par une simple membrane de phospholipides, ce sont des organites polyvalents dont les fonctions varient selon le type cellulaire (291), mais principalement connus pour leur rôle dans le métabolisme des lipides et dans le maintien de l'équilibre redox de la cellule. Leur nombre et leur taille s'adaptent également au contexte cellulaire. Chez l'homme, c'est dans les hépatocytes que les peroxysomes de grande taille sont les plus nombreux (291). Chez les levures, la prolifération et/ou l'augmentation du volume des peroxysomes est induite par la composition du milieu de culture, par exemple en présence de méthanol ou d'une quantité importante d'acides gras (qui sont tous deux métabolisés par les peroxysomes). A l'inverse, un changement de milieu de culture pour un milieu métabolisable par d'autres organites induit une dégradation des peroxysomes surnuméraires et une diminution du volume des peroxysomes restants (292).

a) Biogenèse des peroxysomes

Deux voies de biogenèse coexistent : le modèle « formation de novo » et le modèle « croissance et division des peroxysomes préexistants ».

Modèle « croissance et division »

Selon ce modèle, les peroxysomes se divisent à la manière des mitochondries en trois étapes : élongation, constriction et fission (Figure 30). Dans un premier temps, les peroxysomes grandissent grâce à l'import de protéines membranaires depuis le cytosol et de lipides en provenance du RE, probablement via des sites de contact membranaire entre RE et peroxysomes ou en fusionnant avec des vésicules pré-peroxysomales ; puis un prolongement se forme sous le contrôle de la protéine membranaire Pex11 β , qui permet de courber la membrane en une structure tubulaire (293). Chez les levures, c'est Pex11 (phosphorylée ou non selon le stade d'élongation) qui assure ce rôle : sa sur-expression induit la prolifération des peroxysomes tandis que son inactivation cause l'augmentation de leur volume et la diminution de leur nombre (294). Le cytosquelette participe aussi à l'élongation des peroxysomes en fournissant une force de traction favorisant la croissance de ces prolongements tubulaires via la protéine MIRO1 (mitochondrial rhoGTPase 1, une protéine des microtubules) (295). Ce rôle des microtubules est cependant accessoire dans les cellules de mammifères, où l'élongation des peroxysomes peut fonctionner indépendamment du cytosquelette (293).

La deuxième étape, qui consiste en la constriction du prolongement peroxysomal, est peu connue et son mécanisme n'est pas bien documenté. La troisième et dernière étape de la division des peroxysomes est l'étape de fission à proprement parler, dont le mécanisme est commun à celle des mitochondries. Les protéines adaptatrices FIS1 et MFF sont recrutées au niveau d'un point de constriction du prolongement. Elles interagissent ensuite avec DRP1 (aussi appelé DLP1 pour *dynamamin like protein 1*). Chez les levures, l'homologue de DRP1 (Dnm1) forme un anneau autour du site de constriction et c'est l'hydrolyse de GTP qui fournit ensuite l'énergie nécessaire à la fission (296,297). Chez les mammifères, il a été démontré que DRP1 était recruté à proximité des peroxysomes, au niveau des portions de membrane riches en Pex11, et que l'inactivation de DRP1 causait une diminution du

nombre de peroxysomes dans les cellules (298). Ces observations vont dans le sens d'une homologie entre fission des peroxysomes chez les levures et chez les mammifères.

Modèle « formation de novo »

Le modèle « croissance et division des peroxysomes préexistants » est très bien documenté et semble être la voie de biogenèse la plus importante, mais il est incomplet. En effet, ce modèle ne peut pas expliquer pourquoi, dans des cellules mutantes dépourvues de peroxysomes, la réexpression des gènes non-fonctionnels permet l'apparition de nouveaux peroxysomes. Le modèle alternatif qui expliquerait ce phénomène est celui de la formation *de novo*, qui co-existerait avec le modèle précédent. Selon ce modèle encore émergent, c'est la fusion de vésicules pré-peroxysomales (ppV) issues du RE et des mitochondries (selon la plupart des auteurs) qui donnerait naissance à un peroxysome. Dans un premier temps, certaines protéines de la membrane des peroxysomes (PMP), notamment PEX3 et PEX16, sont insérées co-traductionnellement dans la membrane du RE via le translocon Sec61 (299) et permettent l'insertion post-traductionnelle d'autres PMP (300). Les protéines peroxysomales s'accumulent au niveau de structures appelées pER (*pre-peroxisomal endoplasmic reticulum*), qui bourgeonnent du RE et forment les ERDppVs (*ER-derived ppVs*). Le bourgeonnement des ERDppVs est dépendant de Pex19 chez les levures (301), mais ne semble pas avoir été étudié chez les mammifères. Il existe un homologue de Pex19 chez les mammifères, PEX19, qui pourrait tenir le même rôle. De façon concomitante, des MDppVs (*mitochondria-derived ppVs*) présentant d'autres PMP telles que PEX14 bourgeonneraient des mitochondries. Les ppVs peuvent ensuite fusionner avec des peroxysomes préexistants et les faire grandir, ou fusionner ensemble pour former de nouveaux peroxysomes immatures. L'import des protéines matricielles permet ensuite la maturation de ces peroxysomes et les rend fonctionnels (293).

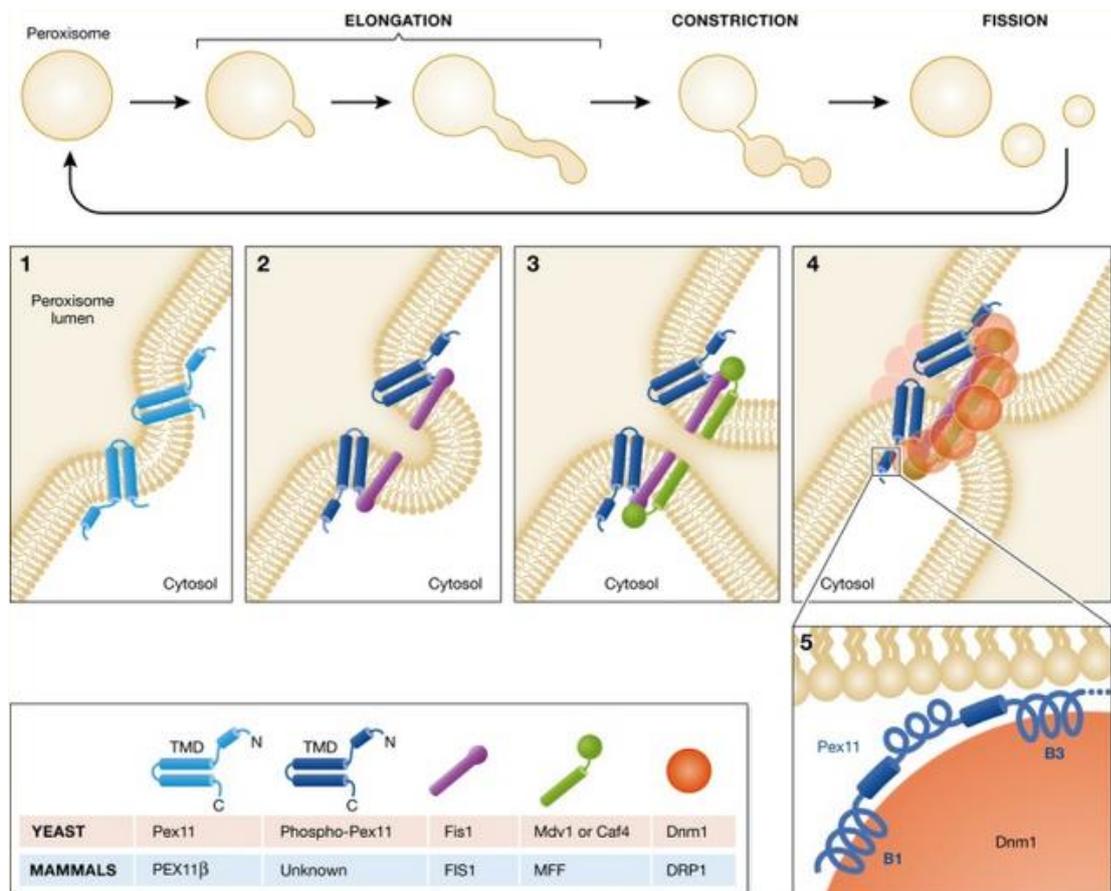


Figure 30 : biogenèse des peroxysomes par fission (tiré de (293)). Les protéines nécessaires à la fission des peroxysomes de levure sont représentées durant les différentes étapes du processus de division : Pex11 (en bleu clair dans sa forme non-phosphorylée, en bleu foncé pour phospho-Pex11), Fis1 (en violet), Mdv/Caf4 (en vert) et Dnm1 (en orange). Les protéines homologues des mammifères sont précisées dans un tableau.

b) Import des protéines membranaires

Les trois protéines nécessaires et suffisantes à la formation de la membrane des peroxysomes et à l'import des PMP sont les peroxines PEX3, PEX16 et PEX19 (302–304). Il a été établi que PEX3 et PEX19 fonctionnaient ensemble pour permettre l'import des PMP (305) mais un débat subsiste concernant la collaboration ou au contraire l'indépendance de PEX16 (306).

Deux modèles d'import des PMP coexistent, un import indirect via le RE (PMP de groupe I) et un import direct depuis le cytoplasme (PMP de groupe II). La plupart des PMP sont synthétisées par des ribosomes libres dans le cytosol et adressées aux peroxysomes post-traductionnellement (307). Elles comportent généralement un signal d'adressage à la membrane des peroxysomes (mPST1). Ces mPTS1 sont des séquences relativement longues de 50 à 100 résidus d'acides aminés présentant une

certaines diversités (308–310). Les PMP présentant une séquence mPTS1 interagissent avec la protéine chaperonne soluble PEX19 (311), qui permet de stabiliser les PMP dans le cytosol en masquant leur domaine transmembranaire. Le complexe PEX19-PMP interagit à son tour avec la protéine d'amarrage PEX3, qui permet l'adressage des PMP de classe II à la membrane des peroxysomes (305). PEX3 est en fait la seule PMP ne présentant pas de mPTS1 mais une autre forme de mPTS, son import dépend du couple PEX19-PEX16 (312). PEX16 présente quant à elle une région mPTS1, son adressage à la membrane des peroxysomes pré-existants est donc dépendant, comme pour la plupart des PMP, du couple PEX3-PEX19. Cette hypothèse problématique d'import mutuel est résolue par l'existence d'une voie alternative, indirecte, médiée par les vésicules pré-peroxysomales en provenance du RE.

c) Import des protéines matricielles

La plupart des protéines matricielles sont adressées aux peroxysomes grâce au PTS1 (peroxisome targeting signal 1). Ce signal se compose d'un tripeptide SKL (sérine – lysine – leucine) présent en C-terminal des protéines concernées et est commun à tous les organismes dotés de peroxysomes (313), bien que des variantes non-canoniques existent chez certaines espèces (314). La protéine réceptrice du PTS1 est la protéine PEX5 (315). PEX5 est une protéine cytosolique dont la structure principale est conservée entre les eucaryotes. Son domaine C-terminal est composé de sept tetratricopeptides (TRP), comprenant chacun 34 acides aminés formant deux hélices, qui interagissent avec le PTS1 via des liaisons hydrogène (316) ; tandis que son domaine N-terminal interagit avec le dimère PEX13-PEX14, situé au niveau de la membrane des peroxysomes via une répétition de motifs WXXXF (tryptophane – XXX – phénylalanine) (317). PEX14 forme avec PEX13 un « docking complex » sur la membrane, qui permet la translocation du complexe PEX5-PTS1 à l'intérieur des peroxysomes par un mécanisme proche des pores nucléaires (318). Cette translocation permet l'import de protéines déjà repliées et d'oligomères dans la lumière des peroxysomes (319). PEX5 est ensuite mono-ubiquitinée en Cys11 par un complexe membranaire composé de PEX2, PEX10 et PEX12, puis relarguée dans le cytosol par un complexe hexamérique ATP-dépendant composé de copies alternées de PEX1 et PEX6, appelé le complexe AAA-ATPase. PEX5 est ensuite désubiquitinée

par des DUBs cytosoliques (*de-ubiquitinating enzymes*) et recommence un cycle de translocation (320).

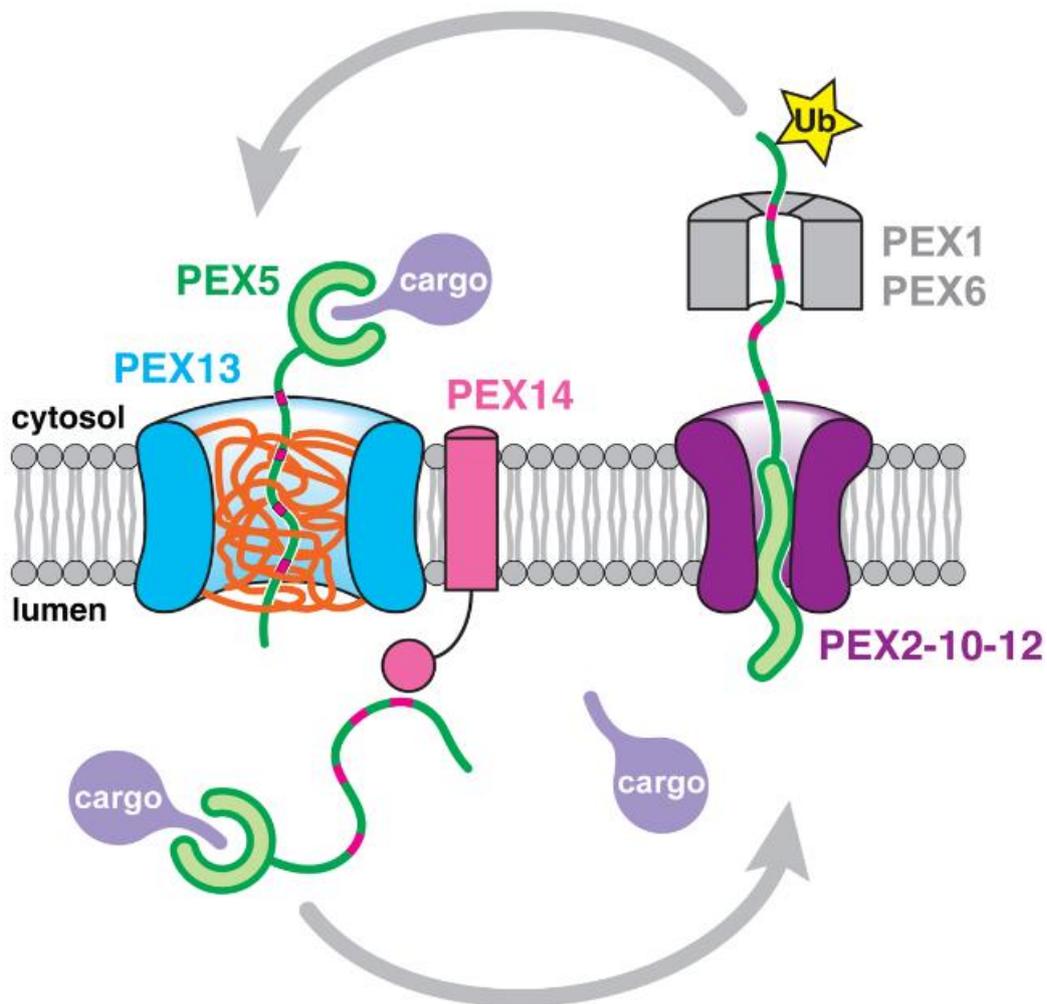


Figure 31 : import des protéines matricielles par interaction avec PEX5 (adapté de (318)). Les protéines cargo présentant le signal PTS1 interagissent avec PEX5 (en vert) et sont transloquées à l'intérieur du peroxysome à travers un pore formé par le complexe PEX13-PEX14. PEX5 est ensuite mono-ubiquitinée par le complexe PEX2-PEX10-PEX12 puis rejoint le cytosol en interagissant avec le canal hexamérique PEX1-PEX6, où elle est désubiquitinée.

Le second signal d'adressage aux peroxysomes est PTS2 (*peroxisome targeting signal 2*). Il est composé de neuf résidus d'acides aminés situés en région N-terminale, suivant le motif RLXXXXHL (arginine – leucine – XXXXX – histidine – leucine) (321), bien que d'autres variantes du motif existent (322). Les protéines porteuses du PTS2 interagissent avec PEX7, une protéine adaptatrice qui interagit avec l'extrémité N-terminale de PEX5 (323). Le complexe PEX7-PTS2 est transloqué dans la matrice des peroxysomes de manière PEX5-dépendante (324). Une fois les

protéines importées dans la matrice des peroxysomes, le signal PTS2 est souvent clivé, contrairement au PTS1 (325). Le retour de PEX7 dans le cytosol est également dépendant de PEX5, puisque l'inhibition de la sortie de PEX5 bloque aussi PEX7 dans les peroxysomes. Cependant, PEX5 et PEX7 ont des cinétiques d'export différentes, ce qui suggère des mécanismes distincts (326).

d) Dégradation des peroxysomes

Les peroxysomes des mammifères ont une demie-vie estimée à environ 36 à 48 heures (327). Les peroxysomes surnuméraires ou endommagés peuvent être dégradés de façon spécifique par trois mécanismes indépendants : le système Lon protéase, l'autolyse et la pexophagie (soit l'autophagie sélective des peroxysomes). L'autolyse est un mécanisme basé sur l'activité de 15-LOX (*15-lipo-oxygenase*), qui rompt les membranes et cause la diffusion de la matrice peroxysomale dans le cytoplasme. Les protéines matricielles excédentaires ou endommagées, comme les enzymes nécessaires à la β -oxydation peroxysomale, peuvent être digérées par POLP, une isoforme de la protéase Lon spécifique des peroxysomes. Il est estimé qu'environ 20 à 30% de la dégradation des peroxysomes advient par ces deux procédés, tandis que les 70 à 80% restants sont imputables à la pexophagie (328).

La pexophagie peut être activée dépendamment ou indépendamment de l'ubiquitine. Les deux récepteurs interagissant avec l'ubiquitine dans le cadre de la pexophagie sont p62 et NBR1. Tous deux possèdent un domaine interagissant avec LC3, qui permet le recrutement des phagophores. p62 n'est pas strictement nécessaire à la pexophagie mais la formation de complexes NBR1-p62 accroît significativement son efficacité (329). Théoriquement, l'accumulation de protéines ubiquitinées à la surface des peroxysomes suffit à déclencher la machinerie d'autophagie (330), mais l'ubiquitination de PEX5 est à ce jour la plus étudiée dans ce contexte. En plus de son rôle dans l'import des protéines matricielles à l'intérieur des peroxysomes, il a été démontré que PEX5, sous sa forme ubiquitinée en Cys11, pouvait servir d'adaptateur aux récepteurs de l'autophagie sélective. En effet, la défaillance du complexe AAA-ATPase, chargé de désubiquitiner PEX5, induit la pexophagie (331). La mono-ubiquitination de PEX5 en Lys209 est également impliquée dans l'induction de la pexophagie en réponse aux ROS : sous l'effet du

stress oxydant, l'ATM-kinase (*ataxia-telangiectasia mutated kinase*) phosphoryle PEX5 en Ser141, ce qui induit sa mono-ubiquitination en Lys209 et sa reconnaissance par p62 (332). PEX5 étant également nécessaire à la biogenèse des peroxysomes, son ubiquitination pourrait servir de contrôle qualité : la mono-ubiquitination de PEX5 dans le cytosol serait un marqueur de peroxysome au mécanisme d'import défaillant (330). La surexpression de PEX3 induit aussi la pexophagie via l'ubiquitination de protéines peroxysomales, mais les protéines ubiquitinées n'ont pas encore été identifiées (333).

Il existe par ailleurs un mécanisme d'induction de la pexophagie indépendant de l'ubiquitine. PEX14 est capable d'interagir avec LC3-II, une protéine ancrée dans la membrane des autophagosomes, dans les cellules CHO privées de nutriments (334). LC3 interagit avec le domaine transmembranaire de PEX14, mais PEX5 inhibe leur interaction de manière compétitive dans des conditions de culture normale. PEX14 interagit préférentiellement avec PEX5-PTS1 plutôt que LC3-II, mais son affinité avec PEX5 diminue lorsqu'elle n'est pas associée à une protéine cargo. Dans ce cas, PEX14 interagit préférentiellement avec LC3-II et permet la formation d'autophagosomes autour des peroxysomes (335).

2) Fonction des peroxysomes

a) Métabolisme des lipides

Les peroxysomes sont responsables, conjointement avec les mitochondries, de la β -oxydation des acides gras. Chez les mammifères, les mécanismes de β -oxydation des deux organites sont similaires mais pas identiques, les enzymes impliquées diffèrent par exemple par leur substrat. En effet, la β -oxydation mitochondriale prend en charge les acides gras les plus courants, dont la chaîne carbonée est composée de 20 carbones ou moins, tandis que la β -oxydation peroxysomale est spécifique des acides gras à très longue chaîne (VLCFA, chaîne ≥ 22 carbones), que les mitochondries sont incapables de dégrader (291). Les produits des deux β -oxydations sont également différents : tandis que les mitochondries dégradent entièrement les acides gras pour produire de l'ATP, la β -oxydation peroxysomale est incomplète, elle produit de l' H_2O_2 (figure 32A) et des acyl-CoA à chaîne moyenne que les mitochondries pourront finir de dégrader (Figure 32 B) (336).

La β -oxydation peroxysomale n'assure pas qu'un rôle de support à la β -oxydation mitochondriale, elle permet également la synthèse de molécules essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. C'est en effet dans les peroxysomes qu'est synthétisé le DHA (C22:6(n-3)) à partir de THA (C24:6(n-3)) en provenance du RE. Le THA, synthétisé par les microsomes, subit un unique tour de β -oxydation peroxysomale et se déleste de deux carbones, ce qui le transforme en DHA (337). Acide gras oméga 3 précieux, le DHA n'est pas dégradé mais exporté hors des peroxysomes pour être incorporé à différents phospholipides (338). Dans le foie des mammifères, la β -oxydation peroxysomale est également nécessaire à la synthèse des acides biliaires. Les précurseurs d'acides biliaires DHC-CoA (*dihydroxycholestanoic-CoA*) et THC-CoA (*trihydroxycholestanoic-CoA*), tous deux issus du cholestérol, sont acheminés du RE vers les peroxysomes via ABCD3. Ils sont alors traités par l'enzyme AMACR (α -méthylacyl-CoA racemase), qui racémise le carbone 25, initialement en configuration R, en son énantiomère S. La racémisation des précurseurs (D/T)HC-CoA au niveau du carbone 25 permet alors à l'enzyme ACOX2 de former une double-liaison au niveau du carbone 24. Les précurseurs des acides biliaires sont ensuite hydratés en 24-hydroxy-(D/T)HC-CoA puis

deshydrogénés en 24-ceto-(D/T)HC-CoA par DBP (*D-bifunctional protein*). La protéine SCPx (*sterol carrier protein X*) clive alors la molécule au niveau du groupement cétone et convertit les 24-ceto-(D/T)HC-CoA en propionyl-CoA (3 carbones) et en CA-CoA (*cholic acyl-CoA*) ou CDCA-CoA (*chenodeoxycholic acyl-CoA*). La coenzyme A est ensuite remplacée par de la taurine ou de la glycine grâce à l'enzyme BAAT (*bile acid-CoA aminoacid transferase*), ce qui aboutit à la synthèse des acides tauro/glycochenodeoxycholique et tauro/glycocholique. Ces acides sont ensuite excrétés des hépatocytes pour rejoindre la vésicule biliaire (339).

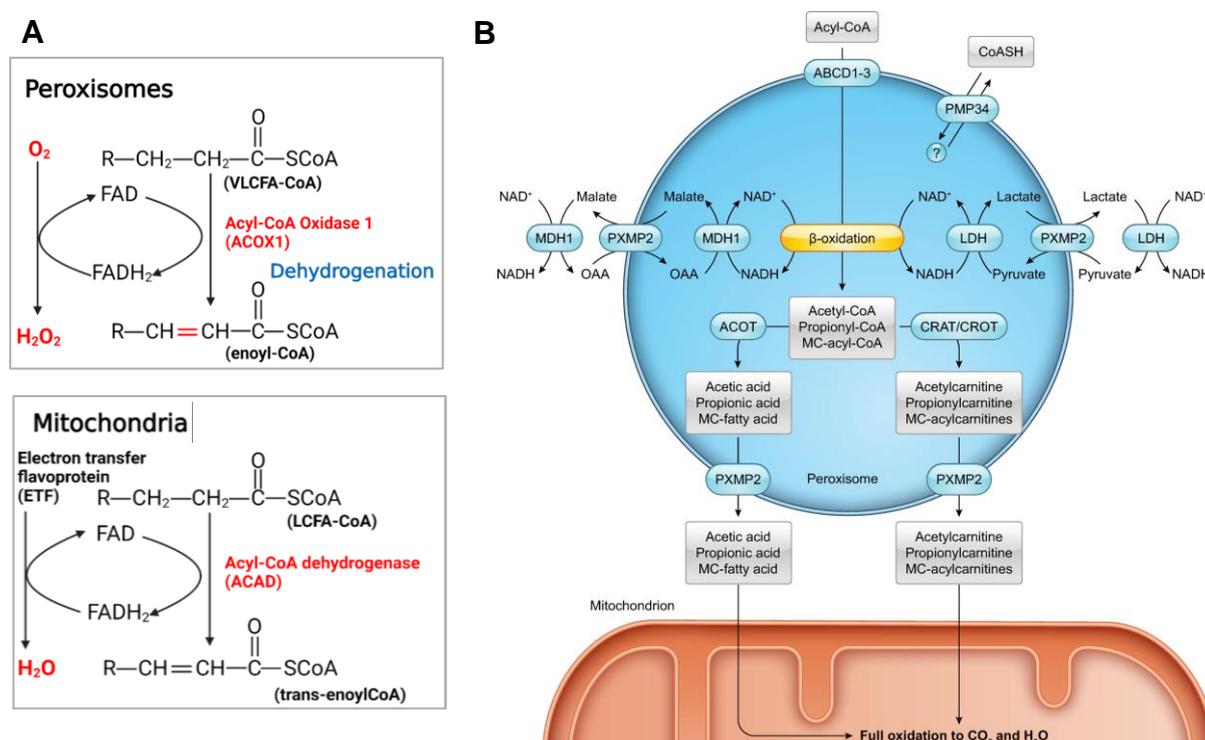


Figure 32 : β-oxydation peroxysomale et mitochondriale (adapté de (291) et (340)). (A) Comparaison de la première étape des β-oxydations peroxysomale et mitochondriale. La première étape de la β-oxydation peroxysomale génère de l'H₂O₂ par réduction du cofacteur FADH₂ en FAD, tandis que lors de la première étape de la β-oxydation mitochondriale, la réduction du cofacteur FADH₂ en FAD est couplée à la chaîne de transfert d'électron et permet la synthèse d'ATP. (B) Echange de lipides entre peroxysomes et mitochondries. Les acyl-CoA à chaîne moyenne (noté MC-acyl-CoA) sont exportés hors des peroxysomes selon deux voies. A gauche, les MC-acyl-CoA sont hydrolysés par des thioestérases peroxysomales en acides gras libres, qui franchissent ensuite la membrane du peroxysome par l'intermédiaire d'un pore formé par une protéine membranaire (la plus étudiée est PXMP2, mais il en existe d'autres) et rejoignent la mitochondrie où ils sont entièrement oxydés. A droite, les MC-acyl-CoA s'échappent du peroxysome par l'intermédiaire de carnitine acyl-transférase (CRAT) et de carnitine octanoyl-transférase (CROT), puis importés dans les mitochondries via la protéine CACT (*carnitin acylcarnitin carrier*).

Les acides gras à chaîne ramifiée présentant un groupement méthyl sur leur troisième carbone, comme l'acide phytanique, ne peuvent pas être dégradés par β -oxydation. Ils doivent d'abord être raccourcis d'un carbone, ce qui place leur groupe méthyl sur le deuxième carbone au lieu du troisième, et rend possible leur dégradation par les voies habituelles. Cette étape de décarboxylation a lieu exclusivement dans les peroxysomes via l' α -oxydation. L' α -oxydation se compose de quatre étapes, qui ne sont pas toutes entièrement comprises (Figure 33).

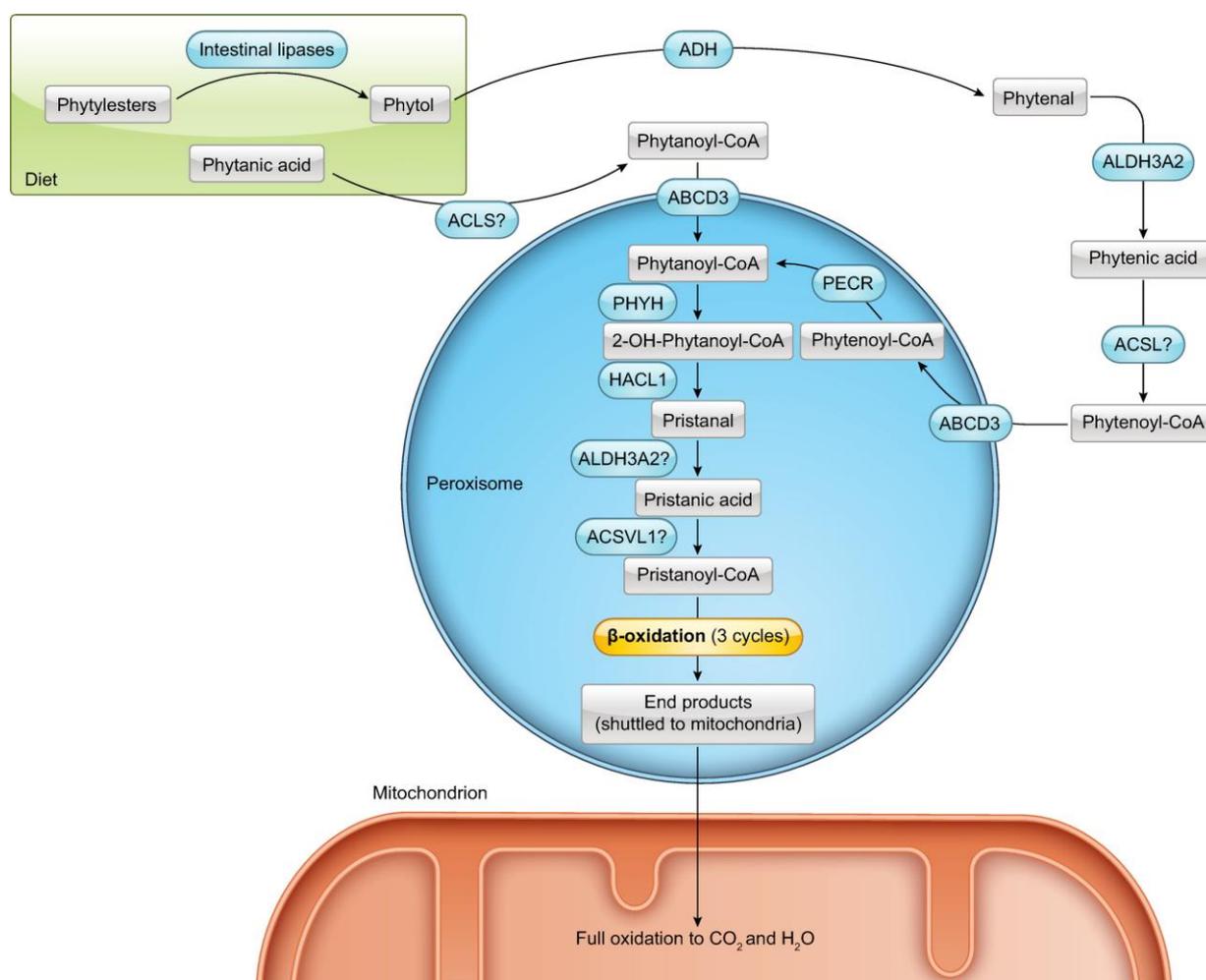


Figure 33 : α -oxydation de l'acide phytanique dans les peroxysomes (tiré de (291)). L'acide phytanique, d'origine majoritairement alimentaire, est acheminé dans la matrice des peroxysomes sous la forme de phytanoyl-CoA par ABCD3 (aussi appelée PMP70). Il est ensuite transformé en 2-OH-phytanoyl-CoA par l'enzyme PHYH (phytanoyl-CoA 2-hydroxylase), puis en pristanal par HACL1 (2-hydroxyacyl-CoA lyase 1). La conversion du pristanal et acide pristanique, puis en pristanoyl-CoA est effectué par des enzymes identifiées de manière encore incertaine, puis le pristanoyl-CoA rejoint la β -oxydation.

En outre, les peroxysomes sont impliqués dans la synthèse de plasmalogènes, aussi appelés étherphospholipides (291). Les plasmalogènes sont constitués d'un squelette de glycérol, dont le premier carbone (sn-1) est lié à un alcool gras par une liaison vinyl-éther, le deuxième carbone (sn-2) est lié à un acide gras et le troisième carbone (sn-3) est lié par l'intermédiaire d'un phosphate à un alcool, le plus souvent choline ou éthanolamine, plus rarement sérine ou inositol. Ces lipides aux propriétés antioxydantes s'intègrent à la membrane plasmique des cellules et auraient un rôle dans la formation et la stabilité des radeaux lipidiques et dans les événements de fusion membranaire. Ils sont indispensables au bon fonctionnement de certains organes vitaux, notamment le cerveau et le cœur, qui sont respectivement enrichis en plasmalogènes composés d'éthanolamine et de choline (341). Les peroxysomes sont indispensables à la synthèse des plasmalogènes car ils possèdent la seule enzyme capable de former la liaison vinyl-éther caractéristique de ces lipides, l'enzyme AGPS (1-alkyl-glycerone-3-phosphate synthase, aussi appelée ADHAP pour 1-O-alkyl-dihydroxyacetone-3-phosphate synthase) (291). La synthèse de ces phospholipides très particuliers est un processus complexe dont les premières étapes ont lieu dans la matrice des peroxysomes et qui s'achève dans le RE (Figures 34 et 35).

De même, certaines étapes de la synthèse du cholestérol adviennent dans les peroxysomes. La synthèse du cholestérol est un mécanisme complexe nécessitant la collaboration de trois organites : les mitochondries, le RE et les peroxysomes (Figure 35). Les peroxysomes synthétisent le farnésyl diphosphate (FPP), précurseur du cholestérol, à partir du mévalonate en quatre étapes, puis l'exportent vers le RE où a lieu la fin de la synthèse du cholestérol. Il existe deux voies d'obtention du mévalonate : la première utilise l'acétyl-CoA produit par la β -oxydation peroxysomale et le convertit *in situ* en mévalonate en trois étapes (deux étapes de condensation puis une de réduction) ; tandis que la seconde utilise l'acétyl-CoA produit par la β -oxydation mitochondriale. Dans ce second cas, l'acétyl-CoA gagne le cytoplasme, où deux molécules d'acyl-CoA sont condensées en acétoacétyl-CoA par une thiolase cytosolique, puis la HMG-CoA synthase y ajoute une troisième molécule d'acyl-CoA pour obtenir de l'HMG-CoA (hydroxyméthylglutharyl-CoA). Le HMG-CoA est ensuite réduit en mévalonate par une réductase située sur la membrane du RE. Le mévalonate entre ensuite dans les peroxysomes, où deux kinases y greffent successivement deux phosphates, avant qu'une décarboxylase le transforme en isopentenyl diphosphate (IPP). Une partie de l'IPP est ensuite converti en FPP par la FPP synthase (342).

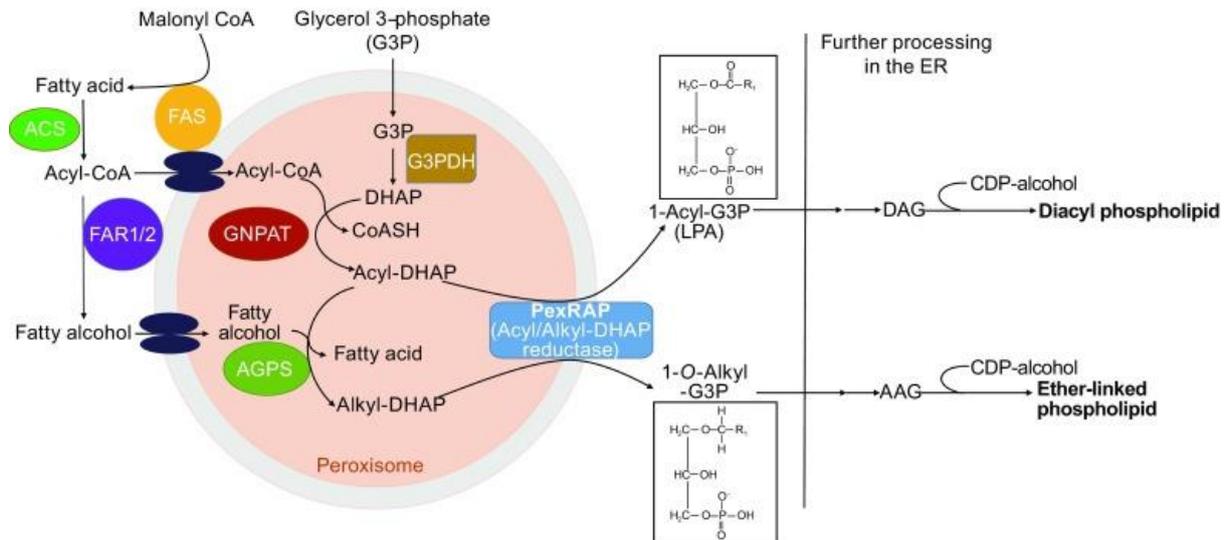


Figure 34 : représentation schématique de la synthèse des plasmalogènes (tiré de (341)). Dans un premier temps, le G3P (glycerol-3-phosphate) est transformé en DHAP (dihydroxyacetone phosphate) dans les peroxysomes par l'enzyme G3PDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase). DHAP est ensuite transformé en acyl-DHAP par l'enzyme GNPAT (glyceronephosphate O-acyltransferase). En parallèle, les acyl-CoA sont transformés en alcool gras par les enzymes FAR1 et FAR2 (fatty acyl-CoA réductases), associées à la membrane des peroxysomes. AGPS catalyse alors la transformation de l'acyl-DHAP en alkyl-DHAP en remplaçant le groupement 1-O-acyldihydroxyacetone phosphate présent sur le premier carbone du squelette de glycérol par un alcool gras, lié au glycérol par une liaison vinyl-éther. PexRAP (une alkyl-DHAP réductase présente sur la membrane des peroxysomes) catalyse enfin la dernière étape peroxysomale et génère le précurseur de plasmalogène AGP (1-O-alkyl-G3P) et le précurseur de diacylphospholipide LPA (lysophosphatidic acid), qui sont exportés des peroxysomes vers le RE où la fin de la synthèse des phospholipides a lieu.

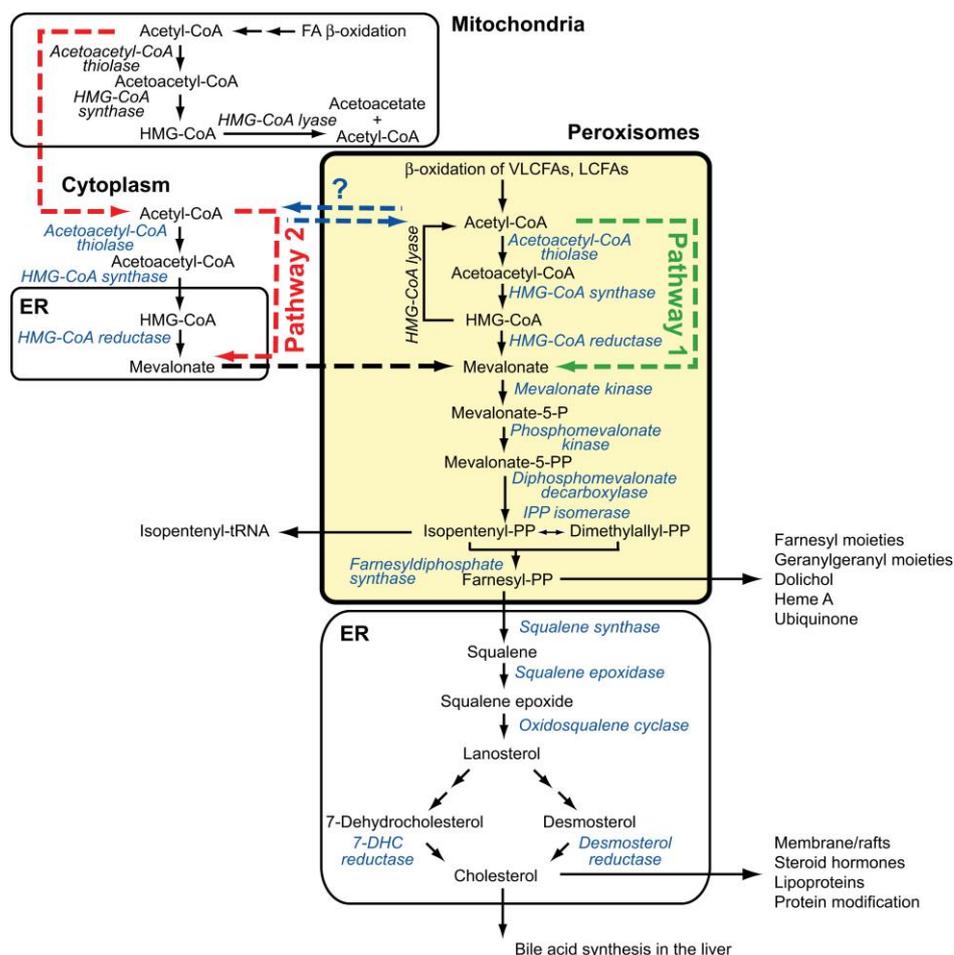


Figure 35 : synthèse du cholestérol (adapté de (342)). Deux voies de synthèse du cholestérol co-existent. La première (en vert) utilise l'acétyl-CoA généré par la β -oxydation peroxysomale et le transforme *in situ* en mévalonate, tandis que la seconde (en rouge) utilise l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation mitochondriale, qui sera transformé en mévalonate dans le RE puis importé dans les peroxysomes. Le mévalonate est ensuite converti en farnésyl diphosphate (Farnésyl-PP) et exporté dans le RE, où il sera transformé en cholestérol. Les enzymes dont l'activité est régulée par SREBP-2 sont indiquées en bleu.

b) Régulation des espèces réactives de l'oxygène

Les peroxysomes produisent jusqu'à 35% des ROS de certaines cellules (343). En effet, de nombreuses enzymes peroxysomales sont sources de ROS, majoritairement sous forme d' H_2O_2 (comme les acyl-CoA oxydases ACOX1 et ACOX2) mais aussi d'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et d'oxyde nitrique $\text{NO}\cdot$ (comme la xanthine oxydase). D'autres ROS pourraient être générés dans les peroxysomes, comme $\cdot\text{OH}$ (à partir d' H_2O_2 réagissant avec des ions Fe^{2+} selon la réaction de Fenton) ou ONOO^- (par réaction de $\text{NO}\cdot$ avec $\text{O}_2^{\cdot-}$) (344). Ces ROS sont métabolisés *in situ* par plusieurs

enzymes antioxydantes répertoriées dans le Tableau 3. L'enzyme principale de la régulation des ROS est la catalase, qui transforme l' H_2O_2 en eau et en dioxygène.

Nom	Acronyme	Substrat	Localisation
Catalase	CAT	H_2O_2	PO, C
Superoxyde dismutase 1	SOD1	$\text{O}_2^{\cdot-}$	C, MT, PO, N
Peroxyredoxine 5	PRDX5	ONOO^- , H_2O_2	C, MT, PO, N
Glutathion S-transferase κ 1	GSTK1	Inconnu	PO
GST1 microsomale	MGST1	Inconnu	RE, MT, PO
Epoxyde hydrolase 2	EPHX2	Epoxydes	PO, C

Tableau 3 : liste des enzymes antioxydantes peroxysomales et de leurs substrats chez l'homme (adapté de (344)). C, cytosol ; MT, mitochondrie ; N, noyau ; PO, peroxysomes ; RE, réticulum endoplasmique.

Paradoxalement, la réponse des peroxysomes au stress oxydatif conduit à l'inhibition de l'import des protéines matricielles via la mono-ubiquitination de PEX5 en Lys209 et la phosphorylation de PEX14 en Ser232, ce qui conduit à la séquestration de la catalase dans le cytosol (345). Certains auteurs suggèrent que PEX5 et PEX14 constitueraient des capteurs redox et maintiendraient la catalase dans le cytosol afin de réguler le stress oxydatif d'origine non-peroxysomale (345,346). Dans ce contexte, la catalase cytosolique pourrait protéger la cellule d'un stress oxydatif aigu, tandis que la catalase peroxysomale régulerait le stress oxydatif basal (347).

c) Immunité innée

Les peroxysomes tiennent un rôle dans l'immunité innée antivirale. En effet, la protéine MAVS, majoritairement localisée à la surface des mitochondries, est également présente au niveau de la membrane peroxysomale (348). Les protéines de la famille des RLR (*RIG-I-like receptor*) sont capables de détecter l'ARN viral dans le cytosol. Les deux RLR les plus connus sont RIG-I et MDA-5, qui détectent respectivement les ARN double-brin courts (≤ 2 kb environ) et longs (≥ 2 kb environ) présentant un triphosphate en 5' grâce à leur domaine hélicase C-terminal (349). Une fois l'ARN viral détecté, les RLR se dimérisent et interagissent via leurs domaines CARD (*caspase activation recruitment domain*) situés en N-terminal avec le domaine CARD de MAVS (lui aussi situé en N-terminal). Les domaines CARD des MAVS

activées vont ensuite s'agréger pour former des filaments et activer plusieurs IRF, des facteurs de transcription qui induisent à leur tour la synthèse d'interféron (350).

Les travaux de certains auteurs suggèrent que l'induction d'IFN par MAVS dépendrait de sa localisation subcellulaire : les MAVS situées à la surface des mitochondries (mtMAVS) induiraient la synthèse d'interféron de type I, tandis que les MAVS peroxysomales (pexMAVS) auraient une cinétique plus rapide et déclencheraient la synthèse d'interféron de type III (351). Selon ce modèle, pexMAVS activerait plutôt une réponse antivirale rapide mais transitoire, en induisant l'expression de plusieurs gènes antiviraux qui inhiberaient la réplication virale, alors que mtMAVS induirait une réponse antivirale plus durable (352). Cependant, cette induction différentielle n'est pas confirmée par d'autres auteurs, qui n'observent aucune différence entre mtMAVS et pexMAVS. Selon eux, MAVS induirait la synthèse d'interféron de type I et III, peu importe sa localisation subcellulaire (353). Enfin, d'autres auteurs suggèrent que pexMAVS induirait également l'expression d'ISG (IFN-stimulated genes) indépendamment de l'interféron (348).

d) Détoxification du glyoxylate

Les peroxysomes sont impliqués dans la détoxification du glyoxylate. Le glyoxylate, produit par le catabolisme de l'hydroxyproline dans les mitochondries et par l'oxydation du glycolate dans les peroxysomes, est un métabolite au potentiel toxique très important car c'est un bon substrat de la LDH (lactate dehydrogenase), qui le convertit en oxalate. En présence de calcium, l'oxalate précipite dans les tissus, notamment dans les reins où apparaît peu à peu une néphrocalcinose, qui conduit à une perte de fonction rénale. Pour cette raison, les taux de glyoxylate sont maintenus à des niveaux très bas en condition physiologique, notamment grâce à l'enzyme peroxysomale AGT (alanine glyoxylate aminotransferase), qui convertit le glyoxylate en glycine (291).

3) Interactions avec les autres organelles

Les peroxysomes interagissent constamment avec d'autres organelles. Ils sont très liés avec le RE et les mitochondries, mais interagissent également avec les gouttelettes lipidiques et les lysosomes (Figures 36 et 37).

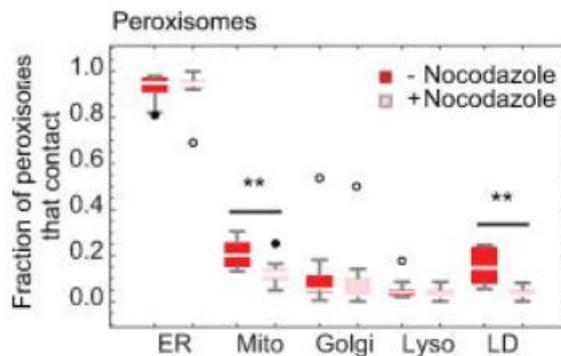


Figure 36 : quantification des peroxysomes en contact avec d'autres organites dans des cellules COS-7 (adapté de (354)). Les peroxysomes interagissent en premier lieu avec le RE (ER), puis avec les mitochondries (Mito), les gouttelettes lipidiques (LD), mais très peu avec l'appareil de Golgi et les lysosomes (Lyso). Le nocodazole, inhibiteur de la polymérisation des microtubules, est utilisé pour déterminer l'importance du cytosquelette dans l'association des différents compartiments cellulaires (condition rose). On peut déduire de cette expérience que le cytosquelette est nécessaire pour l'interaction des peroxysomes avec les mitochondries et les gouttelettes lipidiques, mais qu'il ne tient pas de rôle prépondérant dans leur interaction avec les autres compartiments étudiés.

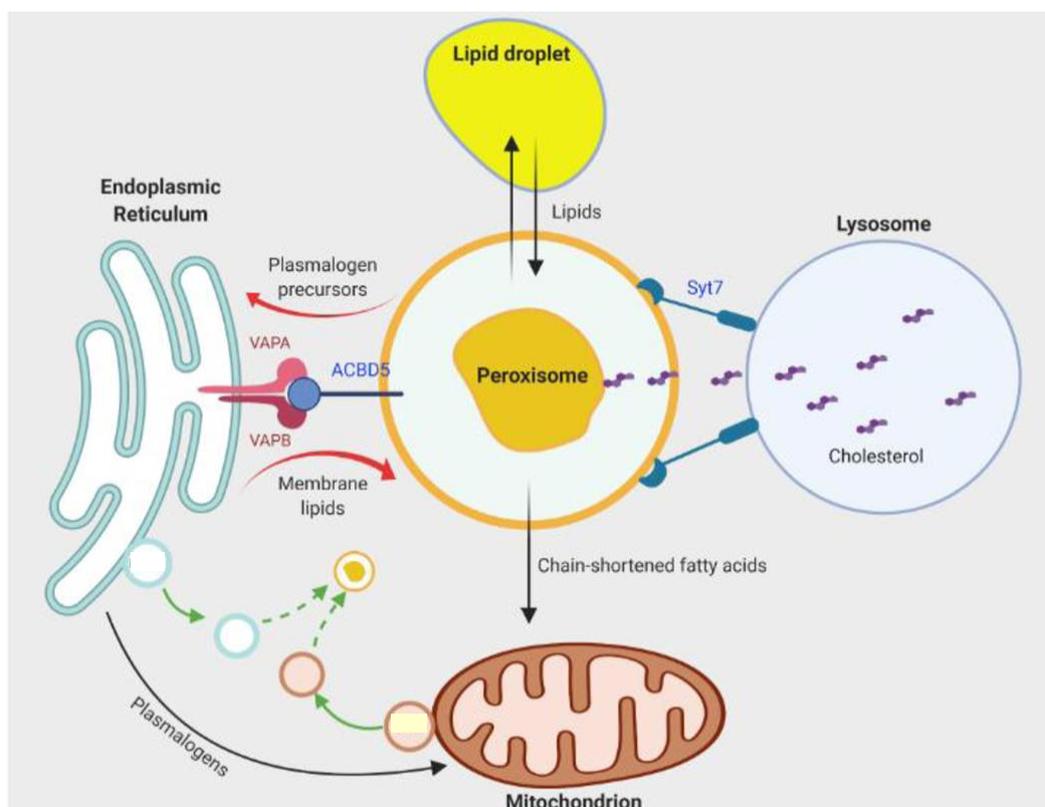


Figure 37 : principales interconnexions entre les peroxysomes et les autres organites (adapté de (347)). La formation de novo et la croissance des peroxysomes nécessitent la fusion de vésicules pré-peroxysomales originaires des mitochondries et du RE. Les peroxysomes exportent les produits de la β -oxydation peroxysomale vers les mitochondries où leur dégradation se poursuit. La synthèse des plasmalogènes est initiée dans les peroxysomes mais se termine dans le RE. Les échanges de divers métabolites entre peroxysomes et RE sont facilités par la formation de sites de contact membranaire via l'interaction d'ACBD5 (acyl-CoA binding domain 5) avec VAP-A et VAP-B. Les peroxysomes interagissent aussi avec les gouttelettes lipidiques lors d'échanges de lipides. Le cholestérol est importé dans les peroxysomes depuis les lysosomes grâce à l'interaction de la protéine membranaire lysosomale Syt7.

a) Réticulum endoplasmique

Comme décrit précédemment (partie II-A-1-a), la biogenèse et la croissance des peroxysomes est en partie imputable au RE, puisque selon le modèle de formation *de novo*, c'est la fusion de deux vésicules pré-peroxysomales issues des mitochondries et du RE qui engendre un peroxysome fils. Ces deux compartiments collaborent par ailleurs dans le cadre de leurs fonctions métaboliques, puisque la synthèse du cholestérol, du DHA, des acides biliaires et des plasmalogènes nécessite un échange de lipides constant entre les deux organelles (voir partie II-A-2-a).

Le RE interagit avec la plupart des autres organites de la cellule, l'interaction RE-peroxysomes a été observée par microscopie électronique dès 1972 (355), mais les protéines permettant cette association sont longtemps restées inconnues. En 2017, Costello *et al.* ont démontré que l'échange de lipides entre peroxysomes et RE était médié par les deux protéines ancrées dans la membrane du RE VAP-A et VAP-B d'une part, et les deux protéines ancrées dans la membrane du peroxysome ACBD4 et ACBD5 d'autre part (356,357). VAP-A et VAP-B présentent chacune à leur extrémité N-terminale cytosolique un domaine MSP (*major sperm protein*) capable d'interagir avec le motif FFAT (*two phenylalanins in an acidic tract*) présent dans la portion cytosolique d'ACBD4 et ACBD5. Les domaines ACB (*acyl-CoA binding*) des protéines peroxysomales permettent ensuite l'import de lipides du RE vers les peroxysomes (Figure 38). D'autres zones de contact membranaire (MCS pour *membrane contact site*) indépendantes d'ACBD4/5 ont été découvertes récemment. Xiao *et al.* ont mis en évidence des MCS médiées par l'interaction entre le domaine C2 situé en C-terminal des synaptotagmines 1, 2 et 3 (Syt1/2/3) présentes à la surface du RE et les molécules de phosphatidylinositol diphosphate (PI(4,5)P₂) constituant la membrane des peroxysomes. Cette interaction permettrait un échange de cholestérol des peroxysomes vers le RE et l'inactivation des Syt1/2/3 induirait l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes, suggérant un flux de cholestérol des lysosomes vers le RE médié par les peroxysomes (358).

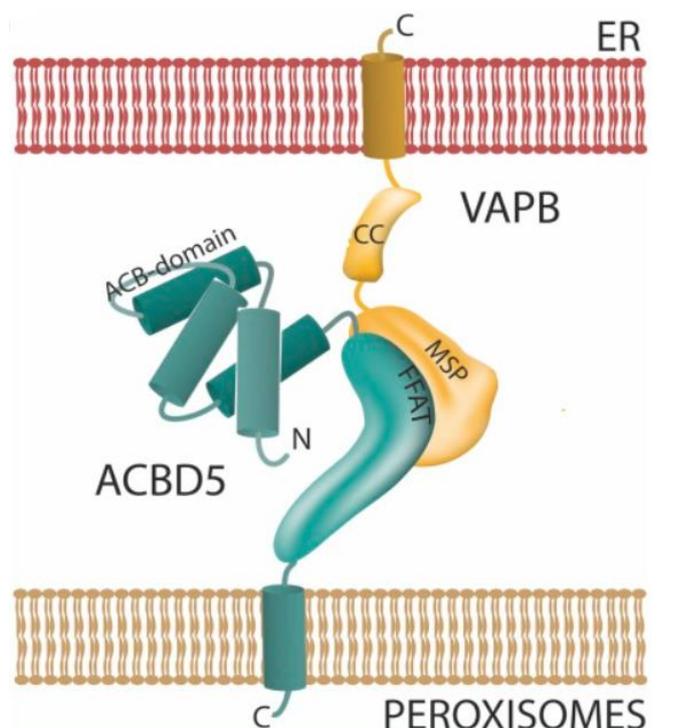


Figure 38 : l'interaction entre ACBD5 et VAP-B permet l'échange de lipides entre les peroxysomes et le RE (adapté de (356)).

b) Mitochondries

Comme décrit précédemment (partie II-A-1-a), la biogenèse des peroxysomes est en partie imputable aux mitochondries, puisque selon le modèle de formation *de novo*, c'est la fusion de deux vésicules pré-peroxysomales issues des mitochondries et du RE qui engendre un peroxysome fils. Par ailleurs, mitochondries et peroxysomes partagent le même mécanisme de fission. Ces deux organelles sont également très liées dans le cadre de leur fonctions métaboliques, puisque les β -oxydations peroxysomale et mitochondriale sont en partie couplées et que le glyoxylate, métabolite issu de la mitochondrie, est détoxifié par les peroxysomes (pour plus de détails, voir partie II-A-2-a). Mitochondries et peroxysomes partagent également leur rôle dans l'immunité antivirale via la protéine membranaire MAVS, présente sur les deux compartiments (voir partie II-A-2-c). Dans certains cas, la perte de fonction d'un organite impacte négativement l'autre. Par exemple, l'inhibition de la catalase ou une augmentation des ROS peroxysomaux a un impact sur l'équilibre redox mitochondrial et peut causer la dépolarisation de leur membrane interne (359).

De par la proximité d'une partie de leurs fonctions, la dynamique des peroxysomes et des mitochondries est liée. En effet, en cas de défaut d'un des deux organites, le volume cumulé de l'autre compartiment est augmenté dans les cellules affectées (360,361). Jusqu'à récemment, cela était interprété comme un phénomène de compensation de la perte de fonction, mais il a été observé qu'un défaut de PEX13, une protéine cruciale pour la fonction peroxysomale car impliquée dans l'import des protéines matricielles, induisait un défaut de mitophagie dans des fibroblastes d'embryon de souris mis en culture (362). Les mécanismes de cette inter-régulation ne sont pas encore élucidés.

Des sites de contact membranaires entre peroxysomes et mitochondries ont été observés en 1977 dans le cœur de rongeurs et de primates (363). La façon dont se forment ces MCS nécessite encore d'être étudiée, mais il semblerait que la protéine ACBD2 (acyl-CoA binding domain 2, aussi appelée ECI2 pour enoyl-CoA delta isomerase 2) soit impliquée. ACBD2 est une protéine présente à la fois dans les mitochondries et les peroxysomes, ce qui suggérerait la constitution via cette protéine d'un pont reliant les deux organites (364). Par ailleurs, il a été démontré que la surexpression de PEX11- β , protéine cruciale pour l'élongation des peroxysomes, induisait l'interaction de protrusions membranaires peroxysomales avec les mitochondries. Tous les peroxysomes peuvent interagir avec la mitochondrie, mais les peroxysomes tubulaires le font plus que les peroxysomes ronds, sans qu'une explication à ce phénomène n'ait encore été découverte. En revanche, une fois la liaison établie, la durée du contact est identique peu importe la forme du peroxysome impliqué (365). Par ailleurs, des MCS impliquant peroxysomes, mitochondries et RE ont également été observés par microscopie électronique (Figure 39), mais leur fonction est encore inconnue.

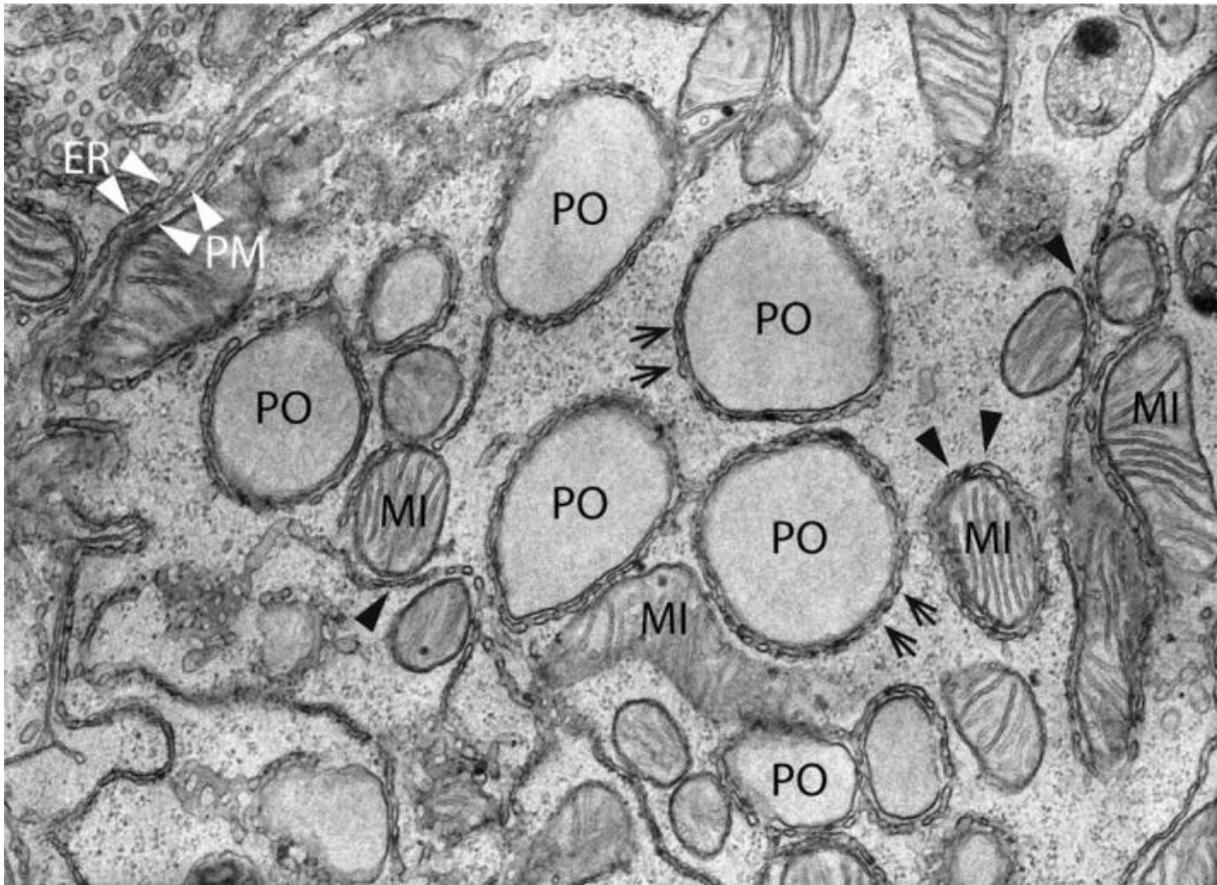


Figure 39 : interaction entre les peroxysomes, les mitochondries et le RE (tiré de (366)). Au centre de l'image, cinq peroxysomes (PO) sont enroulés dans un réseau de réticulum endoplasmique lisse (flèches). Des mitochondries (MI) interagissant avec le RE sont aussi visibles (flèches pleines). Au centre, une mitochondrie allongée est appesée à une zone de contact PO-RE, ce qui suggère l'existence de triple contact.

c) Gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques sont les organites de stockage des lipides neutres de la cellule. Ce stockage est temporaire, les lipides contenus dans les gouttelettes se renouvellent fréquemment avec notamment l'arrivée de lipides issus de l'alimentation. Ainsi, pour maintenir l'homéostasie de la cellule, les lipides stockés dans ces gouttelettes sont régulièrement adressés aux mitochondries ou aux peroxysomes afin d'être dégradés par β -oxydation (367). Il a été observé qu'un défaut de fonctionnement des peroxysomes induisait une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules de souris n'exprimant pas le gène *Pex5* (368). Deux études récentes ont démontré que les deux compartiments communiquaient via des MCS établis grâce à l'interaction de la spastine M1, située sur les gouttelettes lipidiques, avec la protéine peroxysomale ABCD1. Ces deux protéines forment ensemble un complexe d'attache

qui permet la création d'un MCS entre les deux compartiments (369) (370). Le domaine MIT (*microtubule interacting and trafficking*) de la spastine M1 permet par ailleurs le recrutement de deux protéines de la machinerie de remodelage membranaire ESCRT-III (*endosomal sorting complexes required for transport III*), CHMP1B et CHMP8 (*charged multivesicular body protein 1B*), dont l'action permet l'échange d'acides gras entre les gouttelettes lipidiques et les peroxysomes (369). Par ailleurs, les peroxysomes réguleraient également la lipolyse, soit l'hydrolyse des lipides stockés dans les gouttelettes lipidiques par l'intermédiaire de PEX5. En effet, PEX5 induirait le recrutement d'ATGL (*adipose triglyceride lipase*), une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides + acides gras libres, au niveau des MCS entre gouttelettes lipidiques et peroxysomes (370).

d) Lysosomes

Les lysosomes sont des organites de dégradation, c'est notamment dans les lysosomes que les LDL sont dégradées, libérant alors le cholestérol qui sera par la suite recyclé par l'organisme. Le cholestérol issu de la dégradation des LDL transite par les peroxysomes avant de rejoindre le RE, si bien qu'un défaut de peroxysomes cause l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes. Les MCS entre peroxysomes et lysosomes sont causés par l'interaction de Syt7 avec les lipides PI(4,5)P₂, constituants de la membrane peroxysomale (371). Le mécanisme exact d'import du cholestérol dans les peroxysomes via ces MCS reste encore inconnu, mais une étude de 2018 a montré que la kinase PIP4K2A (phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase de type 2 α) contribuait à la génération de PI(4,5)P₂ et favorisait ainsi la formation de MCS et le trafic du cholestérol (372).

B- Maladies peroxysomales

Les peroxysomes assurant des fonctions métaboliques variées en constante interaction avec les autres organelles, il est facile de concevoir que la perturbation de leur fonctionnement induirait une maladie métabolique. Plusieurs maladies impliquent une modification de la fonction peroxysomale : des maladies d'origine génétique, infectieuse, ou liées au vieillissement.

1) Maladies génétiques

a) *Troubles du spectre de Zellweger*

La plupart des maladies génétiques peroxysomales sont regroupées sous le nom de troubles du spectre de Zellweger (ZSD pour *Zellweger spectrum disease*). Elles étaient initialement classées en quatre catégories en fonction de leur sévérité et des symptômes des patients : le syndrome de Zellweger (le plus sévère), l'adrénoleucodystrophie néonatale, la maladie de Refsum infantile et le syndrome de Heimler (le moins sévère) (373), mais on préfère maintenant la dénomination de ZSD sévère, intermédiaire ou légère. Les troubles du spectre de Zellweger rassemblent les maladies génétiques à transmission autosomique récessive touchant l'un des 14 gènes PEX codant pour les peroxines, présentés en tableau 4 (374). Ces gènes codent les protéines indispensables à la biogenèse de peroxysomes matures et leur mutation induit des altérations plus ou moins importantes des fonctions peroxysomales, dont résultent des anomalies métaboliques plus ou moins sévères. Environ 70% des patients atteints de ZSD présentent des mutations au niveau de PEX1 et 26% des mutations au niveau de PEX6, PEX10, PEX12 ou PEX26 (375).

Gene	Fonction
PEX1	Constituant du complexe AAA-ATPase chargé de désubiquitiner PEX5, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX2	Constituant du complexe PEX2/10/12 chargé de l'export de PEX5, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX3	Protéine responsable avec PEX16/19 de l'import des protéines membranaires.
PEX5	Récepteur cytosolique du PTS1, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX6	Constituant du complexe AAA-ATPase chargé de désubiquitiner PEX5, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX7	Récepteur cytosolique du PTS2, nécessaire à l'import de certaines protéines matricielles
PEX10	Constituant du complexe PEX2/10/12 chargé de l'export de PEX5, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX11-β	Protéine membranaire indispensable à la division des peroxysomes
PEX12	Constituant du complexe PEX2/10/12 chargé de l'export de PEX5, nécessaire à l'import des protéines matricielles.
PEX13	Protéine membranaire formant avec PEX14 le docking complex de PEX5. Indispensable à l'import des protéines matricielles.
PEX14	Protéine membranaire formant avec PEX13 le docking complex de PEX5. Indispensable à l'import des protéines matricielles.
PEX16	Protéine responsable avec PEX3/19 de l'import des protéines membranaires.
PEX19	Protéine responsable avec PEX3/16 de l'import des protéines membranaires.
PEX26	Protéine membranaire permettant reliant le complexe AAA-ATPase à la membrane des peroxysomes. Nécessaire à la désubiquitination de PEX5 et donc à l'import des protéines matricielles.

Tableau 4 : liste des gènes responsables des troubles du spectre de Zellweger (adapté de (374)).

Les symptômes cliniques et l'âge auquel ils sont détectés varient en fonction de la sévérité de l'atteinte aux fonctions peroxysomales. Dans les cas les plus sévères, le ZSD est détecté dès la naissance, c'est le ZSD néonatal (correspondant à ce qui était avant appelé maladie de Zellweger). Les nourrissons atteints de ZSD néonatal présentent à la naissance des dysfonctions hépatiques conduisant à une jaunisse et une hypotonie profonde qui rend l'alimentation difficile. Ils souffrent souvent de crises d'épilepsie et présentent des traits caractéristiques, notamment une dysmorphie crâniofaciale (Figure 40A). La surdité et les atteintes oculaires (rétinopathie, glaucome, cataracte) sont typiques des ZSD mais ne sont pas toujours détectées si précocement (373). Une IRM neurocérébrale permet souvent de déceler une dysplasie néocorticale, en particulier la polymicrogyrie périsylienne (un cortex cérébral plus épais avec des

circonvolutions en excès et des sillons peu profonds localisés autour du sillon latéral, aussi appelé scissure de Sylvius, à priori causés par une mauvaise migration neuronale durant le développement), la présence diminuée de substance blanche, un retard de myélinisation, une dilatation ventriculaire bilatérale et des kystes germinolytiques (376). Une chondrodysplasie ponctuée (calcifications ponctuelles au niveau du cartilage) des hanches et des genoux est parfois décrite. Les enfants atteints de ZDS néonatal ont une espérance de vie de moins d'un an (373,377).

Les patients atteints de ZSD de sévérité intermédiaire (correspondant à ce qu'on appelait l'adrénoleucodystrophie néonatale) sont souvent diagnostiqués pendant leur petite enfance. Ces jeunes enfants présentent des symptômes plus variés que ceux atteints de ZSD néonatal, mais un retard de développement, une surdité, une dysmorphie crâniofaciale (Figure 40 B-C) et des atteintes hépatiques (hépatomégalie, hyperbilirubinémie, coagulopathie, niveau élevé de transaminases) et oculaires (cataracte, glaucome ou rétinite pigmentaire, menant souvent à une cécité prématurée ou à une vision tunnel) sont presque toujours constatées. Ces enfants souffrent parfois de crises d'épilepsie, d'insuffisance surrénalienne (378) et de calculs rénaux liés à la précipitation d'oxalate de calcium. Une leucodystrophie (atteinte des gaines de myéline entourant les axones des neurones au niveau de la substance blanche) précoce et évolutive peut apparaître et entraîner une régression cognitive et psychomotrice. Enfin, certains enfants développent une ostéopénie, soit une déminéralisation des os (379). Le pronostic varie d'un enfant à l'autre en fonction des organes impactés, mais leur espérance de vie est très réduite, et la plupart des patients décèdent avant leur adolescence (373).

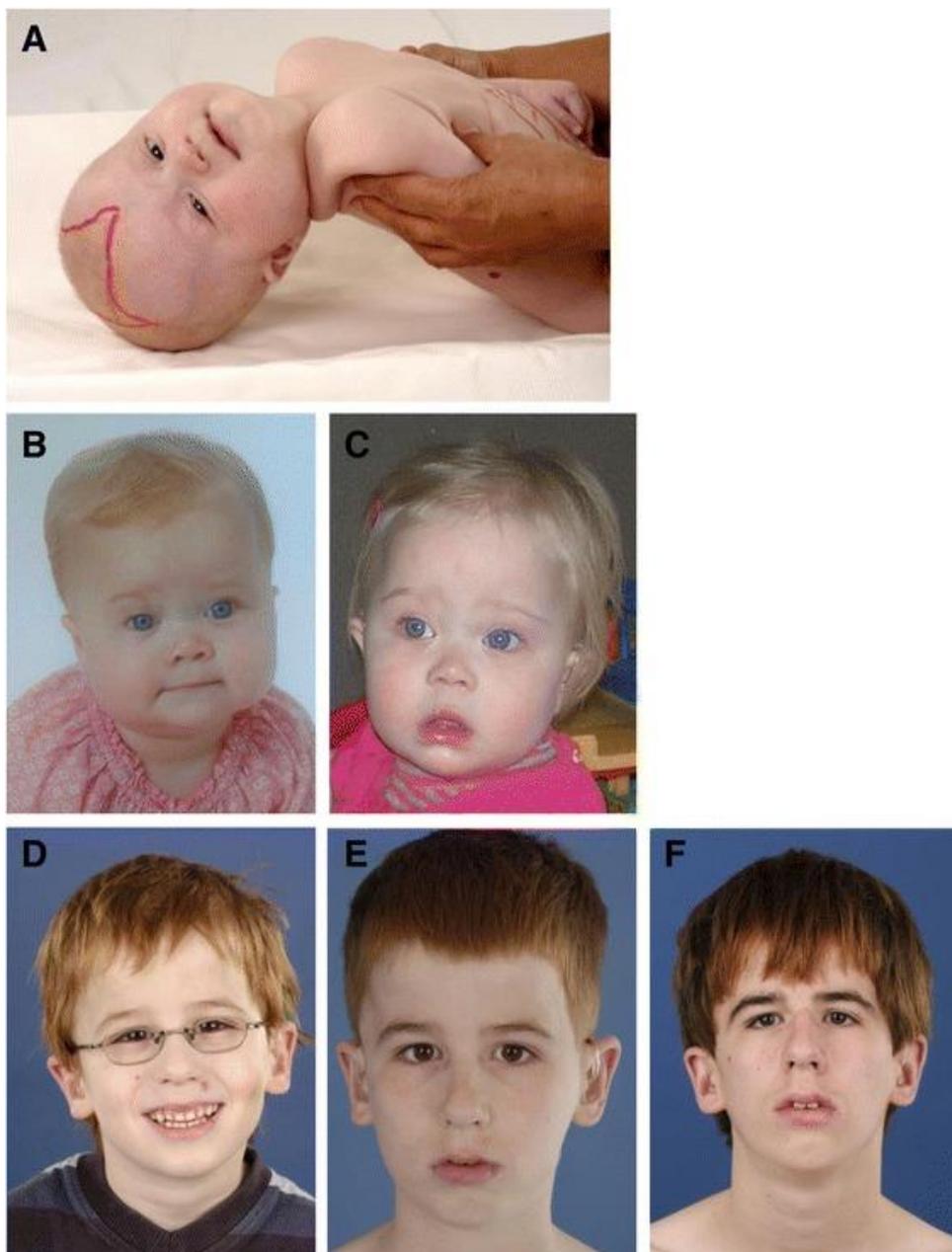


Figure 40 : traits caractéristiques et dysmorphie crâniofaciale d'enfants atteints par un trouble du spectre de Zellweger (tiré de (373)). (A) Photographie d'une petite fille âgée de six mois, présentant la dysmorphie crâniofaciale typique du ZSD sévère : plis épicanthiques (« yeux bridés »), front haut, base du nez élargie, bourrelets sus-orbitaires hypoplasiques (arcade sourcilière très effacée). La fontanelle antérieure, dessinée en rouge est élargie et toujours ouverte. (B-C) Photographie d'une petite fille âgée de neuf (B) et quatorze mois (C) atteinte d'une ZSD moins sévère. Elle présente une dysmorphie crâniofaciale moins prononcée, mais on remarque tout de même un front haut, un nez à base large, une hypoplasie des bourrelets sus-orbitaires et des narines antéversées. Les yeux présentent des plis épicanthiques plus discrets. (D-F) Photographie d'un garçon atteint de ZSD plus légère à l'âge de cinq (D), dix (E) et quinze ans (F) ne présentant pas de dysmorphie crâniofaciale reconnaissable, hormis une implantation basse des oreilles. Le consentement éclairé des parents a été obtenu avant publication de ces images.

Certains patients atteints de forme légère de ZSD ne sont pas diagnostiqués avant leur adolescence, voire même à l'âge adulte. Ces patients présentent des symptômes moins importants, mais les troubles hépatiques, oculaires et auditifs sont les plus communs. Ils peuvent présenter ou non des anomalies crâniofaciales, et bien que les retards de développement soient fréquents, certains patients font preuve d'une intelligence correspondant à la norme sociétale. Des anomalies surrénaliennes sont également décrites, ainsi que des anomalies neurologiques : neuropathie périphérique, ataxie cérébelleuse (maladie neurodégénérative du cervelet et/ou du tronc cérébral induisant une mauvaise coordination et des troubles de l'équilibre), syndrome pyramidal (dégradation progressive de la motricité volontaire, spasticité) (373). L'évolution clinique est en général lentement dégénérative, avec le développement progressif d'une leuco-encéphalopathie, mais il arrive parfois que l'état d'un patient se stabilise pendant plusieurs années (380). Ainsi, l'espérance de vie des patients atteints de ZSD mais survivant jusqu'à l'âge adulte est très variable et dépend principalement de la progression des atteintes hépatiques et neurologiques.

Le diagnostic des ZSD s'effectue d'abord par l'analyse du sang et des urines. Les taux plasmatiques de VLCFA (calcul du ratio C26/C22 ou C24/C22), DHA, THA, acides phytanique, pristanique et pipécolique sont analysés, ainsi que les taux de DHA, THA et d'acide pipécolique dans les urines. En cas d'anomalie ou de persistance des symptômes typiques des ZSD, une culture de fibroblastes est réalisée à partir d'un prélèvement de peau afin d'étudier l'activité des principales enzymes peroxysomales et de réaliser une analyse biochimique complète. Le marquage des peroxysomes par immunofluorescence est aussi réalisé afin de vérifier leur présence ou absence dans les cellules du patient. Enfin, la recherche d'éventuelles mutations des gènes PEX est menée afin de déterminer au mieux la nature du trouble (373). Il n'existe actuellement aucun traitement curatif contre les troubles du spectre de Zellweger, seuls des traitements permettant de soulager certains symptômes (compléments alimentaires, diète adaptée, kinésithérapie, chirurgie ophtalmique, traitement antiépileptique) peuvent être prescrits (381).

b) Adrénoleucodystrophie liée à l'X

L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) est une maladie génétique causée par la mutation du gène ABCD1, situé sur le bras long du chromosome X. Le gène ABCD1 code la protéine du même nom, c'est une protéine responsable de l'import des VLCFA dans la matrice des peroxysomes en vue de leur dégradation par β -oxydation (voir partie II-A-2-a). C'est la maladie peroxysomale d'origine génétique la plus fréquente avec une prévalence d'un cas pour 14 700 naissances aux Etats-Unis (382). L'X-ALD concerne des individus de tous sexes, mais la maladie est plus sévère chez les hommes. La plupart des patients souffrant d'X-ALD présentent une dégénérescence progressive de la moelle épinière appelée adrénomyélongueuropathie (AMN), apparaissant généralement autour de trente ans chez les hommes et après la ménopause chez les femmes (383,384). Cependant, 35 à 40% des hommes atteints d'X-ALD peuvent développer une démyélinisation cérébrale inflammatoire à l'évolution rapide, elle se déclare en général chez les patients entre trois et dix ans. Environ 20% des hommes adultes souffrant d'X-ALD développent également une maladie cérébrale à la progression rapide, qui entraîne l'apparition progressive de handicap puis la mort (385). Par ailleurs, l'X-ALD peut porter atteinte aux glandes surrénales chez 80% des patients masculins (386). De par la nature du gène muté, on observe une accumulation de VLCFA dans tous les tissus des patients atteints d'X-ALD, avec une concentration plus importante dans le cerveau, la moelle épinière, les glandes surrénales et les cellules de Leydig (dans les testicules des patients masculins). Cette accumulation de VLCFA, notamment de C26:0, induit un stress oxydatif et inflammatoire capable d'endommager des cellules gliales de rat (387). Les taux de VLCFA ne sont pourtant pas directement corrélés à la sévérité de la maladie, contrairement à la génération de ROS et aux capacités antioxydantes plasmatiques et cellulaires (388).

Aucun traitement curatif n'est disponible après l'apparition des symptômes neurologiques, mais il a été démontré qu'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques pouvait empêcher la démyélinisation si elle était réalisée avant que l'atteinte cérébrale soit conséquente. Ainsi, un dépistage précoce des hommes des familles identifiées comme étant « à risques », voire même un dépistage systématique chez les nouveaux nés (comme mis en place dans 20 états des Etats-Unis dans le courant des années 2010, ou très récemment aux Pays-Bas), permet d'envisager la guérison (389). Le diagnostic s'effectue par dosage du C26:0 lysophosphatidylcholine

dans le sang par LC-MS-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) (388).

c) Maladie de Refsum non-infantile

La maladie de Refsum est une maladie génétique autosomale récessive liée à la mutation du gène PEX7 (codant la protéine éponyme responsable de l'import des protéines matricielles porteuses du signal PTS2, représentant 10% des cas) ou PHYH (phytanoyl-CoA 2-hydroxylase, représentant 90% des cas). Cette maladie est caractérisée par la dysfonction du catabolisme de l'acide phytanique, qui s'accumule alors dans l'organisme. Les symptômes apparaissent à des stades variés de la vie des patients, de 7 mois à 50 ans. Ils incluent le développement d'une rétinite pigmentaire et une combinaison à des degrés variables d'anosmie (perte de l'odorat), surdité, polyneuropathie, ataxie cérébelleuse et ichtyose (maladie de peau plus ou moins prononcée). Le développement plus tardif de problèmes cardiaques (arythmie, cardiomyopathie) a également été documenté. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif, mais les symptômes peuvent être traités séparément pour ralentir l'évolution de la maladie et contrer ses effets. En complément, une alimentation pauvre en acide phytanique est conseillée (390).

2) Maladies liées au vieillissement

Le fonctionnement des peroxysomes décline avec le vieillissement, notamment concernant la régulation des ROS (391). Cette perte de fonction impacte les autres compartiments cellulaires, en premier lieu les mitochondries qui sont en collaboration étroite avec les peroxysomes. En effet, la surproduction de ROS peroxysomiaux induit la fragmentation des mitochondries et constitue un des signes du vieillissement à l'échelle cellulaire (392). Des études menées en culture cellulaire tendent à prouver qu'au fur et à mesure des passages (et donc du vieillissement des cellules cultivées), l'import des enzymes peroxysomiales est altéré. Une fraction grandissante de la catalase est notamment retenue dans le cytoplasme plutôt que d'être importée dans la matrice des peroxysomes. Ce phénomène est couplé à une augmentation du stress oxydatif global et à la sénescence des cellules en culture. Étonnamment, le nombre

de peroxysomes est plus important dans les cellules sénescents, ce que les auteurs interprètent comme une accumulation de peroxysomes dysfonctionnels au cours du temps (393). Par ailleurs, des analyses par spectrométrie de masse ont montré que l'expression de trente protéines peroxysomales est diminuée avec le vieillissement chez *Caenorhabditis elegans* (394). La perte ou la dérégulation des fonctions peroxysomales a été décrite comme constituante de nombreuses maladies liées à l'âge, parmi lesquelles le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et les cancers (391).

a) *Diabète de type 2*

Le diabète de type 2 est caractérisé par une glycémie anormalement élevée causée par une résistance à l'insuline. Dans un premier temps, l'organisme répond à l'insulino-résistance par l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, mais une défaillance finit par advenir et conduit à une décompensation (395). Le diabète de type 2 est communément appelé « diabète gras », car sa prévalence est significativement augmentée chez les patients souffrant d'obésité. Ces patients présentent fréquemment une accumulation d'acides gras non-estérifiés (NEFA pour *non-esterified fatty acids*). L'augmentation des taux de NEFA induit une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β , voire la mort de ces cellules, c'est ce qu'on appelle la lipotoxicité. Il a été démontré que la lipotoxicité des NEFA était liée aux ROS produits spécifiquement par les peroxysomes (396). L'augmentation des ROS d'origine peroxysomale contribue également à l'évolution de la maladie en favorisant l'apparition de néphropathie et d'arthrite (397–399).

b) *Maladies neurodégénératives*

Le cerveau est un organe riche en lipides, il est ainsi sensible aux défaillances impactant le métabolisme de ces derniers. Il a été démontré que le fonctionnement des peroxysomes, notamment concernant le métabolisme des lipides, était altéré chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. En effet, plusieurs études ont montré une accumulation de VLCFA et une diminution de la présence de plasmalogènes dans le lobe frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (les analyses ont été réalisées post-mortem) (400,401). Par ailleurs, le taux de DHA est

significativement diminué dans l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (400), ainsi que dans le cortex frontal et le cortex temporal (402). En outre, la localisation subcellulaire des peroxysomes est modifiée dans les neurones de patients présentant un stade avancé de la maladie. Ils s'accumulent dans le soma (aussi appelé corps cellulaire ou péricaryon) des neurones, mais sont absents des prolongements neuronaux que constituent les axones et les dendrites (401). De même, l'analyse post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson a montré une modification de la composition lipidique de leurs cerveaux. En effet, l'analyse de la composition des radeaux lipidiques dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie de Parkinson a démontré une diminution drastique de la présence d'acides gras polyinsaturés, notamment de DHA (C22:6(ω -3), synthétisé par les peroxysomes) et d'acide arachidonique (C20:4(ω -6)), couplé à une augmentation des taux d'acides gras saturés (principalement acide palmitique C16:0 et acide stéarique C18:0) (403). Des analyses sanguines et cérébrales ont également établi que les patients atteints de la maladie de Parkinson présentaient de taux de lipides peroxysomaux (DHA, cholestérol et plasmalogènes) diminués (404). Le rôle des peroxysomes dans l'évolution des maladies neurodégénératives n'est pas encore très clair, on ne sait toujours pas si c'est l'altération de leur fonction qui participe à l'apparition de ces troubles ou si la fonction peroxysomale pâtit d'un dysfonctionnement général des cellules concernées.

c) Cancer

Le métabolisme des cellules cancéreuses est souvent profondément remanié, mais varie diamétralement d'un cancer à l'autre. Tandis que le métabolisme des peroxysomes est largement réduit dans le cadre de certains types de cancers, comme les cancers du côlon (405), du sein (406), du foie (407) ou du rein (408) ; il est au contraire augmenté dans la plupart des cas. L'effet pro-tumeur ou anti-tumeur des peroxysomes semble dépendre du contexte cellulaire de la tumeur dans son microenvironnement et serait plus subtil qu'à première vue (409).

Pour commencer, il est important de rappeler que l'augmentation du stress oxydatif est un facteur favorisant l'apparition de cancers. Les peroxysomes étant à la fois générateurs et régulateurs de ROS, il est facile de concevoir que l'augmentation et la diminution de l'activité peroxysomale puissent toutes deux être génératrices de

stress oxydant, selon l'aspect du métabolisme modifié. En effet, une diminution de l'activité de la catalase (et donc du métabolisme peroxysomal), principale enzyme de détoxification de l' H_2O_2 , induit une accumulation de ROS et conduit au stress oxydatif tumorigène. C'est par exemple le cas dans certains hépatocarcinomes (407). A l'inverse, une augmentation de la β -oxydation peroxysomale et en particulier de l'activité d'ACOX1, enzyme catalysant la première étape de cette β -oxydation, induit une augmentation de la synthèse d' H_2O_2 dans les peroxysomes. Ainsi, si cette augmentation du métabolisme lipidique des peroxysomes n'est pas compensée par une augmentation de l'activité des enzymes régulatrices de ROS, alors le stress oxydatif augmente également et favorise l'apparition de cancer. Cela a été observé dans d'autres cas d'hépatocarcinomes (410).

Par ailleurs, la synthèse de plasmalogènes est augmentée dans de nombreux cas de cancer (411–413). Les cellules cancéreuses présentent fréquemment une augmentation de la lipogénèse afin de permettre la synthèse de membranes, essentielles à la croissance cellulaire (414). Le taux de plasmalogènes dans les tumeurs est d'ailleurs corrélé au développement de métastases dans le cadre de cancers du sein, des poumons et de la prostate (415). Certains auteurs suggèrent également que l'accumulation de plasmalogènes augmenterait la tolérance des cellules cancéreuses au stress oxydatif (409). Enfin, une étude génétique récente propose le fait que l'augmentation de la synthèse de plasmalogènes permettrait de maintenir la croissance de la tumeur dans des conditions d'hypoxie. L'hypoxie augmenterait le taux d'acides gras saturés, qui à forte concentration peuvent devenir cytotoxiques. Les peroxysomes détoxifieraient alors ces acides gras saturés en les utilisant pour synthétiser des éthers de phospholipides, en particuliers des plasmalogènes, et permettraient de préserver la croissance de la tumeur, même en condition d'hypoxie (416).

3) Peroxysomes et virus

Les peroxysomes ont été récemment identifiés comme des cibles privilégiées de nombreux virus. Leur rôle important dans l'immunité innée antivirale pousse d'abord les virus à développer des méthodes de désamorçage de la voie des RLR (Figure 41), mais la biogenèse (Figure 42) et le métabolisme des peroxysomes (Figure 43) sont également impactés par de nombreuses infections virales.

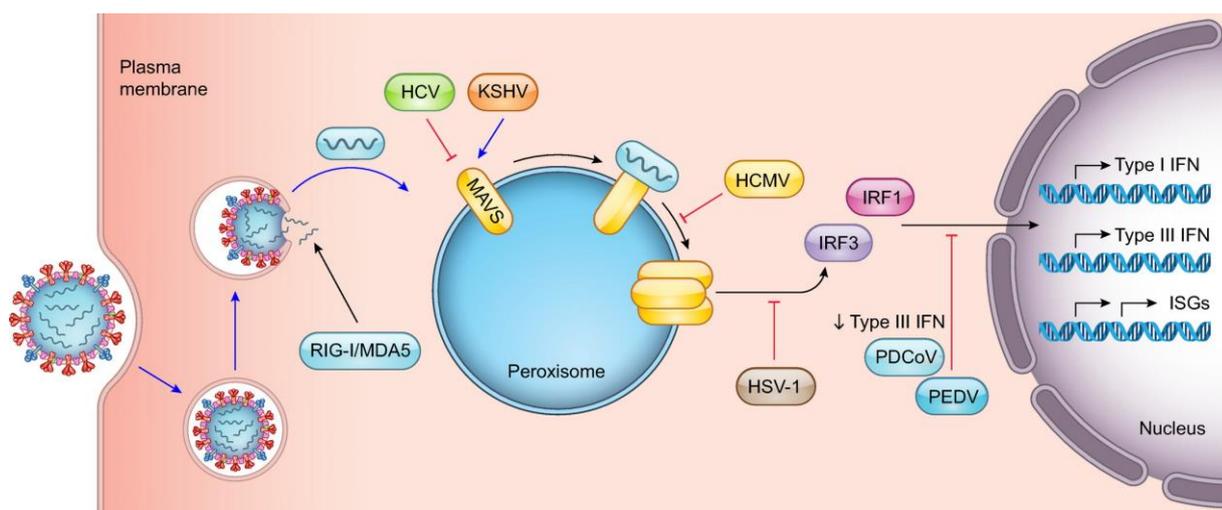


Figure 41 : diversité des stratégies virales pour désamorcer l'activation de l'immunité innée par les peroxysomes (tiré de (291)). HCV (en vert) clive pexMAVS. KSHV (en orange) interagit avec MAVS et induit sa déphosphorylation. HCMV (en jaune) interagit avec MAVS et inhibe son oligomérisation. HSV-1 (en brun) inhibe l'expression IFN-indépendant d'ISG. PDCoV et PEDV (en bleu), deux virus porcins, perturbent l'induction d'IFN de type III dépendant d'IRF1 par un mécanisme encore inconnu. Les flèches noires représentent des événements cellulaires, tandis que les flèches bleues et les traits rouges représentent des événements d'origine virale. Les traits rouges représentent spécifiquement les mécanismes d'inhibition.

a) Désamorçage de l'immunité innée antivirale

Les peroxysomes sont impliqués dans l'immunité antivirale via la protéine MAVS, présente sur la membrane des mitochondries et des peroxysomes et impliquée dans la voie de signalisation de l'interféron par les RLR (pour plus de détails, voir partie II-A-1-c). Les virus ont développé plusieurs moyens de lutter contre le déclenchement de cette immunité antivirale (Figure 41). Certains virus inhibent la voie des RLR, c'est le cas d'HCV dont la protéine NS3-4A clive MAVS (99), mais aussi du HCMV (*human*

cytomegalovirus) et du HSV-1 (*herpes simplex virus 1*). La protéine vMIA (*viral mitochondrial inhibitor of apoptosis*) du HCMV cause le fractionnement des mitochondries et rend ainsi inefficace mtMAVS. Elle interagit également avec PEX19, ce qui lui permet de gagner la membrane des peroxyosomes, où elle interagit avec pexMAVS et inhibe son oligomérisation en présence de MFF (417). HSV-1 inhibe la voie des RLR à de multiples niveaux. Premièrement, la kinase virale US3 hyperphosphoryle IRF3, ce qui empêche sa translocation dans le noyau (418), deuxièmement la protéine virale US11 interagit directement avec RIG-I et MDA-5, ce qui empêche l'activation de MAVS (419). Troisièmement, la protéine virale VP16 inhiberait spécifiquement la voie peroxyosomale en empêchant l'expression IFN-indépendante d'ISG, mais le mécanisme de cette inhibition est encore inconnu (420). D'autres virus détournent la voie de signalisation MAVS. C'est le cas de KSHV (*Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*), qui interagit directement avec MAVS via sa protéine ORF33 et promeut le recrutement de PPM1G, une phosphatase cellulaire qui va désamorcer la voie RLR en déphosphorylant MAVS (421).

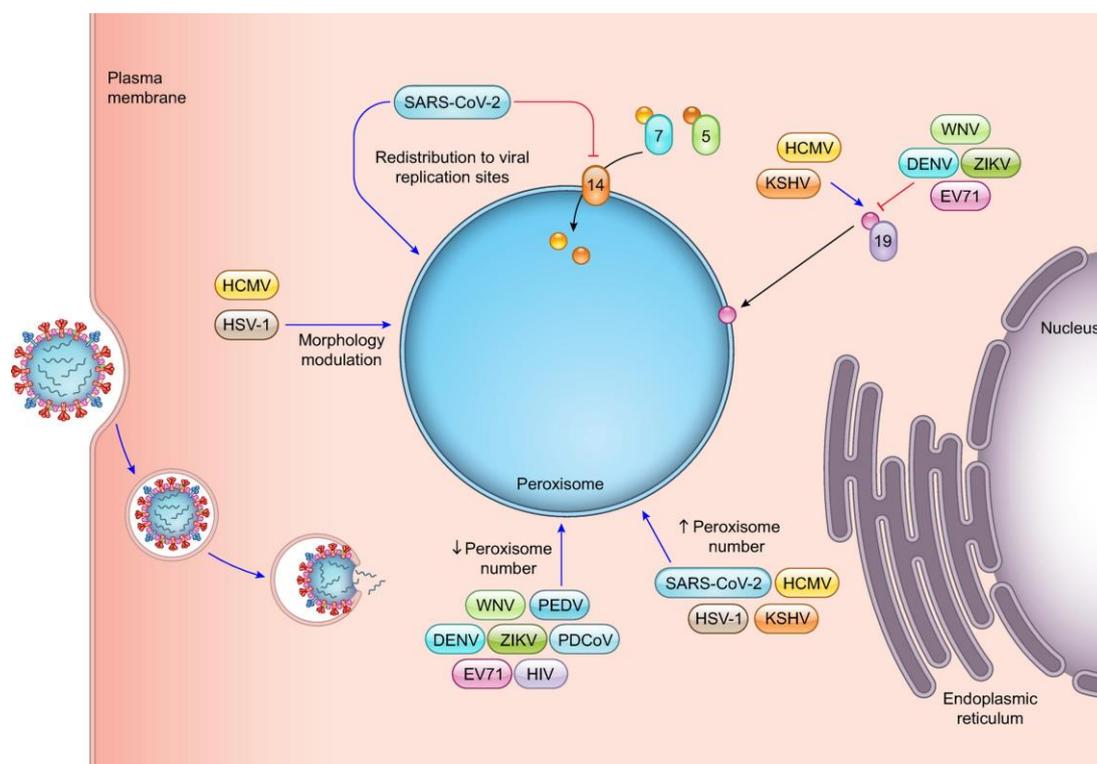


Figure 42 : diversité des stratégies virales pour moduler la biogenèse des peroxyosomes (tiré de (291)). Tandis que certains virus (WNV, DENV, ZIKV, HIV) induisent une diminution du nombre de peroxyosomes, d'autres (HCMV, HSV-1, KSHV, peut-être SARS-CoV2) causent au contraire leur prolifération. Les flèches noires représentent des événements cellulaires, tandis que les flèches bleues et les traits rouges représentent des événements d'origine virale. Les traits rouges représentent spécifiquement les mécanismes d'inhibition.

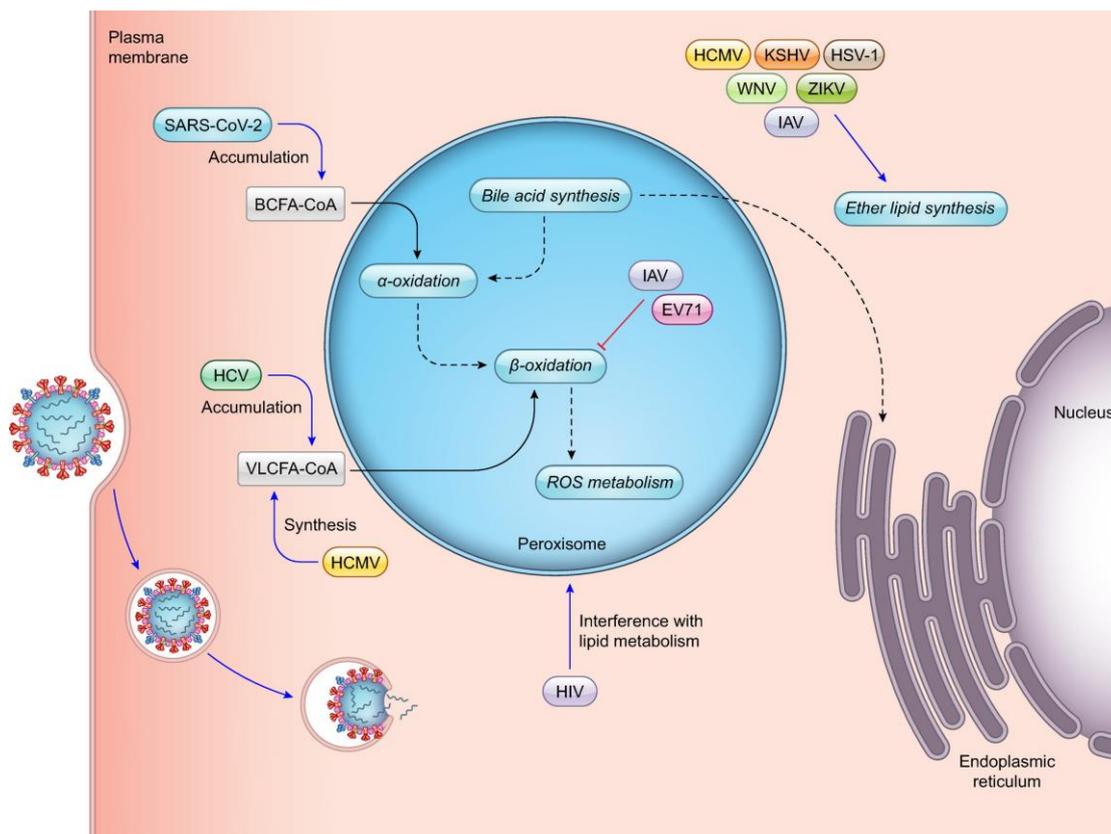


Figure 43 : diversité des stratégies virales pour moduler le métabolisme des peroxysomes (tiré de (291)). Un grand nombre de virus modulent le métabolisme des lipides dans les peroxysomes. Certains virus (herpesvirus, flavivirus, IAV (influenza A virus)) augmentent la synthèse d'éthers de phospholipides, notamment de plasmalogènes, d'autres (IAV, EV71 (enterovirus 71)) inhibent la β -oxydation peroxysomale. HCV et SARS-CoV-2 induisent respectivement d'accumulation de VLCFA et de BCFA par des mécanismes encore inconnus. Les flèches noires représentent des événements cellulaires, tandis que les flèches bleues et les traits rouges représentent des événements d'origine virale. Les traits rouges représentent spécifiquement les mécanismes d'inhibition.

b) Les herpesvirus induisent la prolifération des peroxysomes

Les herpesvirus sont des virus à ADN capable d'infecter les cellules de façon latente. Plusieurs études ont démontré que certains herpesvirus induisaient la prolifération des peroxysomes et détournaient le métabolisme peroxysomal pour maximiser leur prolifération.

En effet, l'infection par HCMV induit une augmentation de l'expression des protéines peroxysomales (422,423). Dans un premier temps, la biogenèse des peroxysomes par fission augmente (à partir de 48 hpi), soutenue par une surexpression de PEX3, PEX16, PEX13 et PEX14. On observe alors une

augmentation significative du nombre de peroxysomes ($\times 3,6$ à 96 hpi), dont la morphologie est par ailleurs modifiée. Ils sont en moyenne plus volumineux et plus allongés, leur ratio membrane/lumen augmente, ce qui semble favoriser le cycle cellulaire d’HCMV. Les mêmes altérations morphologiques et la prolifération des peroxysomes ont également été observées dans des cellules infectées par HSV-1. A partir de 72 hpi, le métabolisme des lipides est à son tour modulé par l’infection virale, on observe alors une augmentation de la synthèse de plasmalogènes dans les cellules infectées. Ces plasmalogènes sont nécessaires à la formation de nouvelles particules infectieuses (423). Une autre étude montre que les MCS entre RE et peroxysomes sont augmentés dans le contexte de l’infection par HCMV et l’expression des quatre protéines qui modulent ces MCS, VAP-A, VAP-B, ACBD4 et ACBD5, augmente significativement. En conséquence, la motilité des peroxysomes est impactée : ils deviennent plus statiques, restent associés au RE et s’élargissent. Les auteurs suggèrent que l’augmentation du volume peroxysomal et des MCS entre RE et peroxysomes serait peut-être en lien avec l’augmentation de la synthèse de plasmalogènes, qui nécessite la coopération étroite des peroxysomes et du RE (424).

Des travaux portant sur KSHV ont eux aussi mis en évidence une augmentation du nombre de peroxysomes dans les cellules endothéliales lors d’une infection latente. Une augmentation du taux de DHA a également été constatée dans ces cellules. Le KO d’ACOX1 ou d’ABCD3, deux protéines clés dans la synthèse de DHA (ACOX1 en tant qu’enzyme catalysant la première réaction de la β -oxydation peroxysomale, ABCD3 pour son rôle dans l’import du précurseur du DHA depuis le RE), n’empêche pas la prolifération des peroxysomes en cas d’infection mais induit une plus grande mortalité cellulaire. Ces résultats suggèrent que l’augmentation de la synthèse de DHA par les peroxysomes serait nécessaire au maintien de l’infection latente (425).

c) SARS-CoV-2 et peroxysomes

L’impact du SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) sur les peroxysomes est l’objet de débats entre deux études aux conclusions contradictoires. D’une part, d’après Cortese *et al.*, le SARS-CoV2 recruterait les peroxysomes à proximité des clusters de DMV, qui abritent les complexes de réplication du virus. De plus, le nombre de peroxysomes et l’expression de ABCD1 seraient augmentés dans les cellules infectées (426). D’autre part, selon Knoblach et

al., la protéine virale ORF9c (aussi appelée ORF14) interagirait avec PEX14 et inhiberait l'import des protéines matricielles dans la lumière des peroxysomes, ce qui aurait pour conséquence une diminution du nombre de peroxysomes matures dans les cellules infectées : un marquage avec un anticorps anti-PST1 a été utilisé pour déterminer les peroxysomes matures. A 48 hpi, le marquage n'était plus ponctué mais diffus, indiquant que les protéines porteuses de PST1 étaient devenues cytosoliques (427).

d) *HIV induit la déplétion des peroxysomes*

HIV-1 favorise l'expression de quatre miRNA (miR-500a-5p, miR-34c-3p, miR-93-3p et miR-381-3p) dans le cerveau et dans les macrophages de patients HIV-positifs souffrant de déficit neurocognitif. Ces miRNA qui diminuent l'expression de PEX2, PEX7, PEX11- β et PEX13, quatre protéines impliquées dans la biogenèse des peroxysomes (428). Ces observations ont été reproduites en culture cellulaire en utilisant différentes lignées immortalisées ainsi que des cellules primaires (429). En conséquence, le nombre de peroxysomes dans les cellules infectées par HIV-1 est diminué. C'est Vpu, une protéine accessoire d'HIV-1, qui induit l'expression de ces miRNA et cause la déplétion des peroxysomes. Ce phénomène est dépendant de la voie Wnt/ β -caténine, puisque l'expression de mutants de Vpu incapables d'interagir avec β -TRCP (*β -transducin repeat-containing protein*, seule protéine de la voie Wnt/ β -caténine interagissant avec Vpu) n'impacte pas le nombre de peroxysomes (429).

e) *Les flavivirus induisent la déplétion des peroxysomes*

Les flavivirus sont des virus enveloppés à ARN positif transmis pour la plupart par les arthropodes. Ils sont phylogénétiquement relativement proches d'HCV (ce sont tous des membres de la famille des *Flaviviridae*) et sont connus pour induire une déplétion des peroxysomes dans les cellules qu'ils infectent.

En effet, WNV (*west nile virus*), DENV (*dengue virus*) et ZIKV (*Zika virus*) induisent tous trois une diminution du nombre de peroxysomes dès les stades précoces de l'infection. Il a été démontré que leurs protéines de capsid interagissent directement avec PEX19, protéine responsable de l'import des PMP (430,431). Dans le cas de WNV et DENV, cette interaction modifie la localisation subcellulaire de

PEX19 et induit sa dégradation. PEX19 étant essentielle à la biogenèse et à la fonction des peroxysomes, sa dégradation induit une diminution significative du nombre de peroxysomes dans les cellules infectées. L'expression des protéines de capsid seules induit une diminution d'environ 20% du nombre de peroxysomes (430). La dégradation de PEX19 n'a pas été démontrée dans le cadre de l'infection par ZIKV, mais puisque l'interaction entre sa protéine de capsid et PEX19 induit également la diminution du nombre de peroxysomes, il est probable qu'un mécanisme similaire existe (431). Par ailleurs, on observe une légère diminution de la quantité de catalase (environ 15%) dans les cellules infectées par WNV et DENV (430), ainsi qu'une suppression de l'induction de l'IFN de type III. Les auteurs suggèrent que la déplétion des peroxysomes pourrait être un nouveau mécanisme pour contrecarrer l'immunité innée antivirale (430).

La recherche concernant l'impact des flavivirus sur le métabolisme des peroxysomes est encore balbutiante, mais une augmentation des taux de plasmalogènes dans le sérum de patients infectés par ZIKV (431) et WNV (432) a été récemment observée.

f) Et HCV ?

Comme décrit précédemment (partie I-C-3-e), HCV induit l'accumulation de VLCFA dans les hépatocytes infectés, probablement en inhibant la β -oxydation peroxysomale. Les travaux réalisés au cours de ces quatre années de doctorat portent justement sur l'étude de l'interaction entre HCV et les peroxysomes et seront détaillés dans la suite de ce manuscrit.

Projet de thèse

Résultats préliminaires et objectifs du projet

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de la réplication d'HCV, le groupe d'Yves Rouillé de l'équipe de Virologie Moléculaire et Cellulaire du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) a procédé à un crible basé sur la biotinylation de proximité. Cette technique, qui avait déjà été utilisée pour étudier les protéines interagissant avec les complexes de réplication du MHV (murine hepatitis virus) (433), permet d'identifier les protéines évoluant à proximité des complexes de réplication d'HCV en les biotinylant dans un rayon de 20 nm. Pour ce faire, un réplicon de souche JHF1 a été conçu en fusionnant la peroxydase APEX2 dans le domaine 3 de NS5A (434). Une fois ce réplicon introduit dans des cellules Huh-7, l'ajout de BP (biotin phenol) et d'H₂O₂ a causé la biotinylation des protéines à proximité de NS5A-APEX. Les protéines biotinylées ont ensuite été purifiées sur des billes de streptavidine puis identifiées par spectrométrie de masse. La protéine peroxysomale ACBD5 est apparue parmi les cinq premiers *hits* de ce crible. Après vérification par Western blot que la biotinylation d'ACBD5 était bien spécifique de l'activité d'NS5A-APEX (Figure 44A), un immunomarquage a été réalisé pour étudier sa localisation subcellulaire dans les cellules naïves et répliquant le génome d'HCV (Figure 44B-E). Ces marquages ont démontré qu'ACBD5 colocalisait partiellement avec NS5A, marqueur des complexes de réplication d'HCV, tout en restant associée à d'autres marqueurs des peroxysomes (PEX14 en figure 44C-D, catalase en données non montrées) ; ce n'est donc pas simplement ACBD5 mais les peroxysomes eux-mêmes qui sont partiellement recrutés à proximité des complexes de réplication d'HCV. Par ailleurs, une fraction des cellules répliquant le génome viral présente des peroxysomes moins nombreux et élargis (Figure 44D-E).

Les objectifs de ce projet de thèse étaient donc de caractériser l'altération de la morphologie et de la localisation subcellulaire des peroxysomes induite par HCV, de déterminer le rôle potentiel des peroxysomes dans le cycle viral et d'étudier l'impact d'HCV sur le métabolisme des peroxysomes.

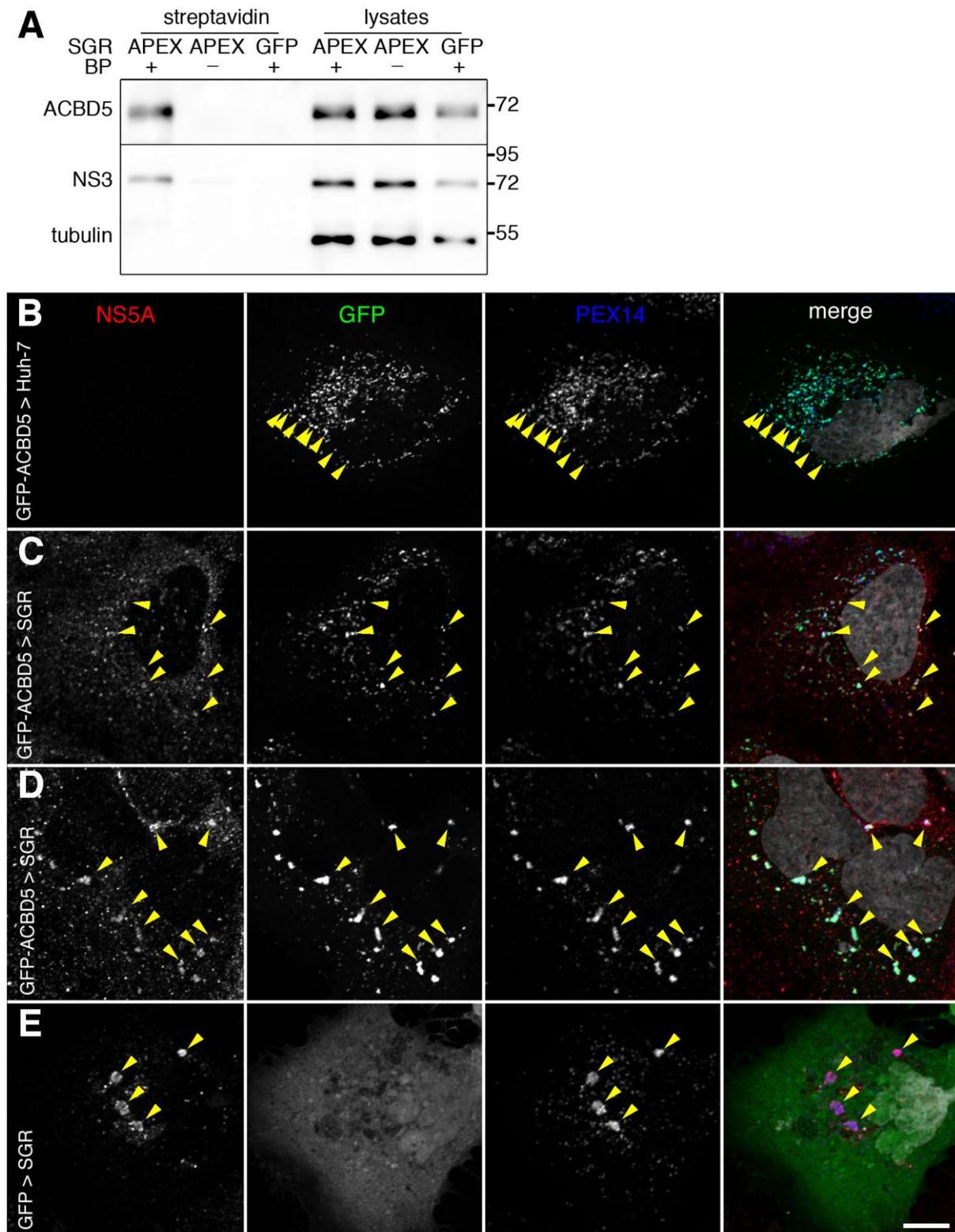


Figure 44 : ACBD5 est un *hit* du cribre NS5A-APEX. (A) La biotinylation d'ACBD5 est induite par NS5A-APEX. Des cellules Huh-7 exprimant un réplicon NS5A-APEX ou NS5A-GFP ont été pré-incubées en présence (+) ou absence (-) de BP, traitées avec de l'H₂O₂ puis lysées dans du tampon RIPA. Les protéines biotinylées ont été purifiées avec des billes de streptavidine et analysées par immunoblot avec des anticorps ciblant les protéines NS3, ACBD5 et tubuline. (B-E) Localisation subcellulaire de GFP-ACBD5, transfectée dans des

cellules Huh-7 naïves (B) ou contenant un réplicon (C-D). La GFP a été transfectée en tant que contrôle dans des cellules Huh-7 contenant un réplicon (E). Les cellules transfectées ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-NS5A (en rouge) et anti-PEX14 (en bleu), puis photographiées au microscope confocal. Les protéines GFP-ACBD5 et GFP (en vert) ont été détectées via la fluorescence de la GFP et les noyaux ont été marqués au DAPI (en gris sur la colonne de droite). Les pointes de flèches jaunes indiquent des exemples de structures où les marqueurs sont co-distribués. La barre d'échelle représente une longueur de 10 μm .

Matériels et méthodes

Réactifs

Les milieux de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) et OptiMEM (milieu essentiel minimal), ainsi que le D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) et la généticine ont été fournis par ThermoFischer Scientific, le DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) par Molecular Probes, le mowiol 3-88 par Calbiochem, l'agent de transfection TransIT-LT1 par Mirus Bio. Tous les autres réactifs ont été fournis par Sigma.

Anticorps

Les anticorps monoclonaux (mAb) de souris 9E10 anti-NS5A (154) et 486D39 anti-NS3 ont été respectivement fournis gracieusement par C. M. Rice (The Rockefeller University) et J.-F. Delagneau (Bio-Rad). Les anticorps de lapin anti-PEX14 et anti-PEX5 ont été fournis par ProteinTech. Les anticorps de lapin anti-ACBD5 et anti-PMP70, ainsi que le mAb de souris anti- β -tubuline TUB2.1 ont été fournis par Sigma. Le mAb de lapin anti-catalase a été fourni par Cell Signaling Technologies. Le mAb14F3.2 de souris anti-PEX3 a été fourni par Millipore. Le mAb de souris anti-TOM20 a été fourni par BD Biosciences. Le mAb de souris anti-myc a été produit in vitro en utilisant un appareil MiniPerm (Heraeus) selon le protocole du fabricant. Tous les anticorps secondaires conjugués à une HRP ou aux fluorochromes A488-, Cy3-, ou Cy5, ainsi que les billes de streptavidine conjuguées à une HRP ou au fluorochrome Alexa 488 ont été fournis par Jackson Immunoresearch.

Plasmides

Le plasmide pEGFP-ACBD5 (356) a été amicalement fourni par M. Schrader (University of Exeter). Le plasmide pcDNA-myc-CD2AP a été amicalement fourni M. Cormont (Université Côte d'Azur). Les plasmides exprimant les constructions roGFP2 pMF1707, pMF1706 et pMF1762 (392) ont été amicalement fournis par M. Fransen (Katholieke Universiteit Leuven) via Addgene. Le plasmide pX330-U6-Chimeric_BB-

CBh-hSpCas9 (435) a été amicalement fourni par F. Zhang (Addgene plasmide # 42230). Afin de construire le plasmide pmCherry-SKL, oligonucleotides synthétiques 5'-GATCTAAGCTTTG-3' et 5'- AATTCAAAGCTTA-3' ont été phosphorylés, annealés and insérés entre les sites de restriction BgIII et EcoRI du plasmide pmCherry-C1 (Clontech).

Culture cellulaire

Les cellules Huh-7 (436) et Huh-7w7 (Huh-7 n'exprimant pas CD81) (437) ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur et du glutamax.

Virus

Les virus utilisés dans cette étude sont la souche JFH1 originale de génotype 2a (151) ou une souche dérivée portant des mutations d'adaptation à la culture cellulaire et la reconstitution de l'épitope A4 dans la protéine E1 (438) et la souche adaptée à la culture cellulaire DBN3a de génotype 3a (160). Afin de générer l'ARN génomique de ces différentes souches, les plasmides ont d'abord été linéarisés par l'enzyme de restriction XbaI, puis traités par la MBN (mung bean nuclease) et utilisés comme matrices pour la transcription *in vitro* effectuée grâce au kit MEGAscript fourni par Ambion. L'ARN généré *in vitro* a été introduit dans les cellules Huh-7 par électroporation (153) afin d'obtenir les stocks de virus nécessaires aux futures infections (439). Les titres infectieux ont été mesurés selon la méthode TCID₅₀. Pour les analyses de cinétique, les cellules infectées ont été trypsinées la veille du point de cinétique, comptées et 1.5x10⁵ cellules ont été platées dans des plaques P-24 dans 1 mL de DMEM. Les titres infectieux ont été mesurés après 24 heures de culture. Concernant les expériences avec les cellules Huh-7 PEX3-KO et PEX5-KO, un test de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des différences mesurées au niveau des titres infectieux en comparaison avec le groupe contrôle Huh-7.

Réplicons

Le plasmide pSGR-JFH1 codant le SGR de souche JFH1 a été fourni par T. Wakita (153). Le plasmide pSGR-JFH1-GFP codant un SGR de souche JFH1 contenant la séquence codante de la GFP insérée dans le domaine III d'NS5A a été décrit par Sahuc *et al.* (440). Afin de construire un replicon de souche DBN3a exprimant la RLuc, l'extrémité 3'-UTR de DBN3a a été amplifiée par PCR en utilisant les primers 5'-GCAGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCCTGCC-3' et 5'-TCATACGCGTTGGGCGGCGGATGGTGTTCCTTTTGG-3' puis insérée au niveau des sites de restriction EcoRI et MluI du plasmide pSGR-JFH1-RLuc, pour générer le plasmide pSGR-JFH1-RLuc/3'UTR3a. Un fragment d'ADN contenant l'IRES de l'EMCV et la séquence codante de la partie N-terminale de la protéine NS3 de souche DBN3a ont été assemblés par PCR de fusion tripartite grâce aux paires de primers 5'-CCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGG-3' / 5'-TGTGATCGGGGCCATGGTATCATCGTGTTC-3', 5'-GATGATACCATGGCCCCGATCACAGCATAACCC-3' / 5'-ATGAAGGTAgCCGACTTGATAGCT-3', et 5'-AGCTATCAAGTCGGcTACCTTCAT-3' / 5'-CTGCTCTAGAGCACTCACAGAGAACAACCGAG-3' puis insérés au niveau des sites de restriction KpnI et BsiWI du plasmide pSGR-JFH1-RLuc/3'UTR3a pour générer le plasmide pSGR-JFH1/3a-RLuc/3'UTR3a. Enfin, le fragment BsiWI-XbaI de DBN3a a été inséré au niveau des mêmes sites de restriction de pSGR-JFH1/3a-RLuc/3'UTR3a. La mutation GND mutation a été introduite par PCR de fusion en utilisant les primers 5'-AGGTCGACTCTAGACATGATCTGC-3' / 5'-TTTCTTGTCTGCGGAaATGATCTG-3' et 5'-CACCACGACCAGATCATtCCGCA-3' / 5'-ATGTGGACCTCAAAGAAGACCC-3'. Le produit de PCR a été digéré par NotI et XbaI puis insérée au niveau des sites correspondants dans le plasmide pSGR-DBN3a-RLuc. Afin de construire un SGR de souche DBN3a exprimant un marqueur de résistance à la néomycine, la séquence codante de la néomycine-phosphotransférase a été obtenue par PCR avec les primers 5'-GGGAGAGGGTTTAACTCAGAAG-3' et 5'-CCCAACGCGTATGATTGAACAAGATGGATTG-3', puis le produit de PCR a été digéré par PmeI et MluI et inséré aux sites correspondants dans le plasmide pSGR-DBN3a-RLuc. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage. L'ARN du SGR transcrit *in vitro* a été introduit dans des cellules Huh-7 par électroporation (153). Les cellules électroporées ont été cultivées jusqu'à quatre jours post-électroporation

pour les SGR exprimant la RLuc, ou maintenus sous pression de sélection par ajout de 0,5 mg/mL de généticine dans le milieu de culture pour générer des cellules Huh-7 exprimant les SGR JFH1 ou DBN3a de façon permanente.

Génération de cellules KO

Le KO des gènes d'intérêt a été réalisé en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 (441). Des oligonucléotides synthétiques correspondant aux séquences codant les ARN-guides ont été commandés, puis phosphorylés avec la T4-polynucleotide kinase, annealés et insérés entre les sites de restriction BbsI du plasmide pX330 (441). Les séquences codantes des ARN guides utilisés sont CTCCAGCTGCAAGAACTCC, AGATGCTGTGGATGTAAGTC et CTTGTAGGGGTACCAGTTTG pour générer les lignées cellulaires PEX5-KO et CACCTCCAAGGACCGTGCCC, TAAAGATGCTGAGGTCTGTA et CATATTTCTAGCTTGTTTGA pour générer les lignées cellulaires PEX3-KO. La transfection des cellules Huh-7 et la sélection des lignées KO ont été réalisées comme décrit par Ferlin *et al.* (442).

Immunofluorescence

Les cellules ont été immunomarquées pour permettre la détection par immunofluorescence de protéines virales et cellulaires comme décrit par Rouillé *et al.* (443). Les lamelles sur lesquelles les cellules étaient cultivées ont été montées sur lame de verre avec du Mowiol. La microscopie confocale a été réalisée sur un microscope confocal LSM880 (Zeiss) avec un objectif à immersion dans l'huile 63x /1.4. Les signaux ont été acquis séquentiellement. Pour certaines images en haute-résolution, un détecteur Airy Scan en mode super-résolution (SR) a été utilisé sur ce même microscope. Les images ont ensuite été traitées par le logiciel Zen version 2 (Carl Zeiss Microscopy). Les figures ont été assemblées en utilisant le logiciel Adobe Photoshop. Les coefficients de corrélation de Pearson (PCC) ont été calculés en utilisant le plugin JACoP du logiciel ImageJ. Pour chaque condition, au moins trente cellules ont été analysées.

Etude de la morphologie des peroxysomes

Des cellules Huh-7 ont été infectées avec les souches JFH1 ou DBN3a d'HCV à une MOI de 0,1 et gardées en culture dans un laboratoire NSB3. Elles ont été passées la veille des temps de cinétique d'intérêt sur des lamelles de verre (environ 5×10^4 cellules), puis fixées 24 h plus tard avec une solution de PFA à 3% puis immunomarquées comme décrit précédemment avec des anticorps anti-NS5A et anti-PEX14. Des piles d'images ont été acquises pour les cellules d'intérêt avec un microscope confocal inversé Eclipse Ti (Nikon) équipé d'un dispositif CSU-W1 spinning-disk (Yokogawa, Roper Scientific). Un module live-SR (Gataca Systems) a été ajouté au système pour améliorer la résolution des images. Les observations ont été réalisées avec un objectif à immersion dans l'huile 60x (Nikon Plan Apo 60x NA 1.4). Les signaux ont été acquis séquentiellement. Les piles d'images ont été analysées grâce au logiciel Imaris pour modéliser une image 3D des peroxysomes. Les objets plus petits que $0,1 \mu\text{m}$ ont été retirés de l'analyse et le volume de chaque objet a été mesuré, permettant d'établir le volume de chaque peroxysome et le nombre moyen de peroxysomes par cellule. Pour chaque mesure, trente cellules provenant de trois infections indépendantes ont été analysées. L'analyse statistique a été réalisée via un test de Kruskal-Wallis, en comparant chaque condition à la condition contrôle.

Association entre peroxysomes et complexes de réplication

Des cellules Huh-7 ont été infectées avec les souches JFH1 ou DBN3a d'HCV à une MOI de 0,1 et gardées en culture dans un laboratoire NSB3. Elles ont été passées la veille des temps de cinétique d'intérêt sur des lamelles de verre (environ 5×10^4 cellules), puis fixées 24 h plus tard avec une solution de PFA à 3% puis immunomarquées comme décrit précédemment avec des anticorps anti-NS5A et anti-PEX14. Des piles d'images ont été acquises pour les cellules d'intérêt avec un microscope confocal inversé Eclipse Ti (Nikon) équipé d'un dispositif CSU-W1 spinning-disk (Yokogawa, Roper Scientific). Un module live-SR (Gataca Systems) a été ajouté au système pour améliorer la résolution des images. Les observations ont été réalisées avec un objectif à immersion dans l'huile 60x (Nikon Plan Apo 60x NA 1.4). Les signaux ont été acquis séquentiellement. Les piles d'images ont été

analysées grâce au logiciel Imaris pour modéliser une image 3D des peroxysomes et des complexes de réplication. La plus courte distance entre chaque peroxysome et le complexe de réplication le plus proche a été mesurée, permettant de calculer la distance moyenne entre chaque peroxysome et le complexe de réplication le plus proche à différents temps post-infection. Pour chaque mesure, trente cellules provenant de trois infections indépendantes ont été analysées. L'analyse statistique a été réalisée via un test de Kruskal-Wallis.

Mesure des ROS

Des plasmides exprimant des rapporteurs roGFP2 localisés dans le cytosol, les mitochondries et les peroxysomes ont été transfectés dans des cellules Huh-7 contrôle, ou contenant un réplicon JFH1 ou DBN3a cultivées sur des plaques « glass-bottom 4 well μ -slide » (Ibidi). A 18 hpi, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS stérile et placées dans du DMEM dépourvu de rouge de phénol. De l' H_2O_2 à une concentration finale de 0,4 mM a été ajouté sur des cellules Huh-7 naïves afin de constituer un contrôle positif. Deux heures plus tard, les cellules vivantes ont été imagées avec le microscope confocal LSM880 (Zeiss) muni d'une chambre d'incubation (37°C, 5% de CO_2) en utilisant un objectif à immersion dans l'huile 63x /1.4. Une fois les conditions d'acquisition fixées pour chaque construction roGFP2, toutes les images ont été acquises avec les mêmes paramètres. Les images ont été acquises en excitant séquentiellement les cellules transfectées avec des lasers de longueur d'onde 405 et 488 nm, puis analysées avec le logiciel ImageJ. Une région d'intérêt (ROI) a été délimitée autour de la cellule entière, puis l'intensité de fluorescence moyenne a été mesurée pour les deux canaux. Les ratios d'intensité moyenne de fluorescence 405/488 ont ensuite été calculés, puis les données ont été analysées avec un test statistique de Kruskal-Wallis en comparant chaque condition à la condition contrôle.

Western blot

Les cellules ont été lysées avec un tampon de lyse constitué de tampon TrisCl (50 mM, pH 7,5) contenant 100 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1% de Triton X-100, 0,1% de

sodium dodecyl sulfate (SDS) et des inhibiteurs de protéase pendant 20 min sur glace. Les cellules lysées ont ensuite été collectées et leurs noyaux ont été culotés. La concentration en protéines des surnageants a été déterminée par la méthode BCA selon le protocole du fournisseur (Sigma), avec comme standard de la BSA. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur des membranes de nitrocellulose (Hybond-ECL; Amersham) avec un appareil Trans-Blot (Bio-Rad). Le blocage a été réalisé dans du PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0,1% de NP-40. Les protéines d'intérêt ont été révélées avec des anticorps primaires spécifiques, suivi d'anticorps secondaires espèce-spécifiques conjugués à une HRP, puis les membranes ont été incubées avec l'ECL Super Signal West Pico, selon le protocole du fournisseur (ThermoFischer Scientific). Les signaux ont été acquis avec un appareil LAS 3000 (Fujifilm). Les signaux non-saturés ont ensuite été quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ.

Mesure de l'activité catalase

L'activité de l'enzyme catalase a été mesurée grâce à un kit de test colorimétrique selon le protocole du fournisseur (Abcam, ref AB83464) à partir de lysats cellulaires. Les données ont été normalisées par quantité de protéines, mesurée selon la méthode BCA (Sigma).

Lipidomique

Des cellules Huh-7 naïves, contenant un réplicon JFH1 ou DBN3a ou PEX3-KO ont été cultivées dans du DMEM puis trypsinées, comptées et séparées en quatre culots de quatre millions de cellules. Les culots ont été rincés trois fois au PBS, puis les tubes ont été flushés à l'azote pour éviter l'oxydation des lipides, avant d'être plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des lipides. Concernant l'extraction, les culots cellulaires ont été solubilisés dans 1 mL d'eau contenant 5 mM d'EGTA et du méthanol (1:2, v/v). Les acides gras totaux ont été extraits selon la méthode décrite par Bligh et Dyer (444) dans un mélange de dichlorométhane, eau et méthanol (2,5:2,5:2, v/v/v) avec 2% d'acide acétique, en présence du standard interne de glyceryl trinodécanoate (4 µg). Les extraits ont ensuite été centrifugés pendant 6

min à 2500 rpm. L'extrait lipidique a été hydrolysé dans 1 mL de solution de KOH 0,5 M dans du méthanol à 55°C pendant 30 min. Une seconde extraction a été réalisée avec 1,5 mL de méthanol, 2 mL d'eau et 2,5 mL de dichlorométhane. Les extraits lipidiques ont été séchés à l'azote puis traités au PentafluoroBenzylBromide dans de l'ACN (1%) et au Diisopropylethylamine dans de l'ACN (1%) (1/1, v/v). Les extraits finaux (1 µL) ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse Thermo Trace 1310 couplé au spectromètre de masse Thermo TSQ 8000 EVO. L'ionisation est réalisée par ionisation chimique, l'hélium est utilisé comme gaz porteur et une colonne HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) a été utilisée pour la séparation. Le four est réglé à 180°C pendant 1 min, puis la température augmente jusqu'à 315°C (+6°C/min) pendant 2 min. La méthode SIM est utilisée pour détecter les composés (m/z 255 pour C16:0, m/z 297 pour le standard interne et m/z 395 pour C26:0). La quantification est obtenue grâce aux courbes de calibration externes.

Spectrométrie de masse

Les protéines totales ont été déposées sur SDS-PAGE afin de réaliser une digestion par la trypsine d'un morceau de gel pour chaque échantillon. Les peptides ont été extraits avec 0,1% d'acide formique dans de l'ACN, évaporés pour réduire le volume à 8 µL et injectés sur un système UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été automatiquement fractionnés une colonne à inversion de phase commerciale C18 (75 µm x 500 mm, particule de 2 µm, colonne PepMap100 RSLC, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), température 55°C). Le piégeage des peptides a été réalisé pendant 4 min (5 µL/min) avec le solvant A (98% d'H₂O, 2% d'ACN et 0,1% d'acide formique). L'élution a été réalisée avec deux solvants, A (0,1% d'acide formique dans l'eau) et B (0,1% d'acide formique dans de l'ACN) avec un flux de 300 nL/min. Le gradient de séparation était de 3 à 20% B pendant 170 min. La colonne a été équilibrée pendant 6 min avec 3% de tampon B avant l'analyse du prochain échantillon. Les peptides élués de la colonne C18 ont été analysés avec des instruments Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Le voltage de l'électrospray était de 1,9 kV et la température capillaire était de 275°C. L'analyse MS a été acquise sur l'analyseur Orbitrap sur le m/z 400–1200 range avec une résolution de 70 000 (m/z 200). La valeur-cible était de 3.00E+06. Les quinze pics les plus

intenses avec des charges comprises entre 2 et 5 ont été fragmentés sur le HCD avec une énergie de collision normalisée de 27%, et le spectre de masse en tandem a été acquis avec un analyseur Orbitrap, avec une résolution de 17,500 à m/z 200. La valeur cible était de $1.00E+05$. La sélection du seuil ionique était de $5.0E+04$ et la valeur maximale de temps d'accumulation des ions étaient de 250 ms pour un full MS scan et 100 ms pour les spectres de masse en tandem. L'exclusion dynamique était réglée à 30 s.

Analyse des données de protéomique

Les données collectées lors des analyses LC-MS/MS ont été converties en format liste de pics *.mgf avec le logiciel Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Les données MS/MS ont été analysées avec Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK), installé sur un serveur local. Les recherches ont été réalisées avec une tolérance de mesure de masse de 0,02 Da pour le précurseur et 10 ppm pour les fragments ionisés selon une base de données construite avec Human Swissprot database (taxonomie 9606), fusionnées avec les séquences de la trypsine recombinante, des protéines virales NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, et une liste de contaminants communs. Le carbamidométhylation des cystéines, l'oxydation des méthionines, l'acétylation N-terminale des protéines et la propionamidation des cystéines ont été traitées comme des modifications variables. Un clivage trypsine manquant a été toléré. Les résultats ont été importés sur le logiciel Proline (<http://proline.profiproteomics.fr>) (445). Les alignements de spectre de peptides plus grands que neuf résidus avec un score ionique >10 ont été retenus. Le taux de faux-positifs a ensuite été optimisé pour être inférieur à 1% grâce au score Mascot Modified Mudpit. La quantification basée sur l'EIC (Extracted Ion Current) a été réalisée avec le logiciel Proline 2.0. Un seul niveau de charge a été sélectionné pour chaque peptide. Ensuite, pour les peptides ne comportant pas de spectre, ceux dont l'abondance était au-dessus de la borne supérieure de l'intervalle de confiance à 99% ont été écartés. L'abondance d'une protéine a été obtenue en additionnant l'abondance des peptides correspondants. L'analyse statistique a été réalisée sur R (version 4.1.2). Les données ont été transformées en log2 et la distribution a été centrée sur le troisième quartile. Seules les protéines avec au minimum trois mesures dans au moins un groupe ont été

conservées. Les valeurs manquantes ont été imputées selon une distribution normale $X \sim (\mu - 1.8\sigma, 0.3\sigma)$, selon les recommandations de Tyanova *et al.* (446). L'analyse différentielle de l'expression des protéines entre les Huh-7 contrôles et SGR-JFH1 et entre Huh-7 contrôles et SGR-DBN3a ont été réalisées grâce au package limma R (447), qui utilise une approche empirique Bayésienne pour estimer les variances des t tests modérés. Les p -valeurs brutes ont été ajustées selon la procédure de Benjamini–Hochberg (448). Les protéines ont été considérées comme différenciellement exprimées si leur p -valeur ajustée était inférieure à 0,05. Afin d'évaluer l'habileté des protéines peroxysomales à discriminer ensemble les groupes, une analyse multivariée a été réalisée avec le package R mixOmics, en utilisant l'approche PLS-DA (partial least squares – discriminant approach) (449). Seules les protéines peroxysomales ont été conservées pour l'analyse multivariée

Résultats

Le recrutement des peroxysomes est indépendant d'ACBD5

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au mécanisme de recrutement des peroxysomes à proximité des complexes de réplication. Pour ce faire, nous avons établi la cinétique d'association des deux compartiments dans des cellules Huh-7 infectées par les souches JFH1 et DBN3a. Des piles d'images de cellules naïves ou infectées à différents temps post-infection ont été acquises au microscope confocal à super-résolution et traitées par le logiciel Imaris afin de reconstituer une image 3D des peroxysomes et des complexes de réplication des cellules d'intérêt. La distance la plus courte entre chaque peroxysome et le complexe de réplication le plus proche a ensuite été mesurée. Tandis qu'on observe un rapprochement progressif des deux compartiments au cours du temps et une augmentation du pourcentage de peroxysomes en contact direct avec au moins un complexe de réplication avec la souche DBN3a (Figure 45 A-B), aucune tendance ne se dégage avec la souche JFH1 (Figure 45 C-D).

Nous avons ensuite tenté d'identifier le mécanisme de recrutement des peroxysomes à proximité des complexes de réplication. Notre première hypothèse résidait dans un recrutement indirect médié par ACBD5. En effet, ACBD5 interagit avec les protéines réticulaires VAP-A et VAP-B (356), elles-mêmes recrutées à proximité des complexes de réplication par interaction avec NS5A (222,223), ACBD5 pourrait donc participer au recrutement des peroxysomes de manière indirecte. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des lignées de cellules Huh-7 ACBD5-KO grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Un clone a ensuite été isolé de cette population par dilution limite et l'inactivation d'ACBD5 a été contrôlée par western blot (Figure 46A). Un réplicon a ensuite été introduit dans ces cellules ACBD5-KO et le recrutement des peroxysomes à proximité des complexes de réplication a pu y être observé au microscope confocal (Figure 46B). Ainsi, le recrutement des peroxysomes ne dépend pas, ou pas seulement, d'ACBD5.

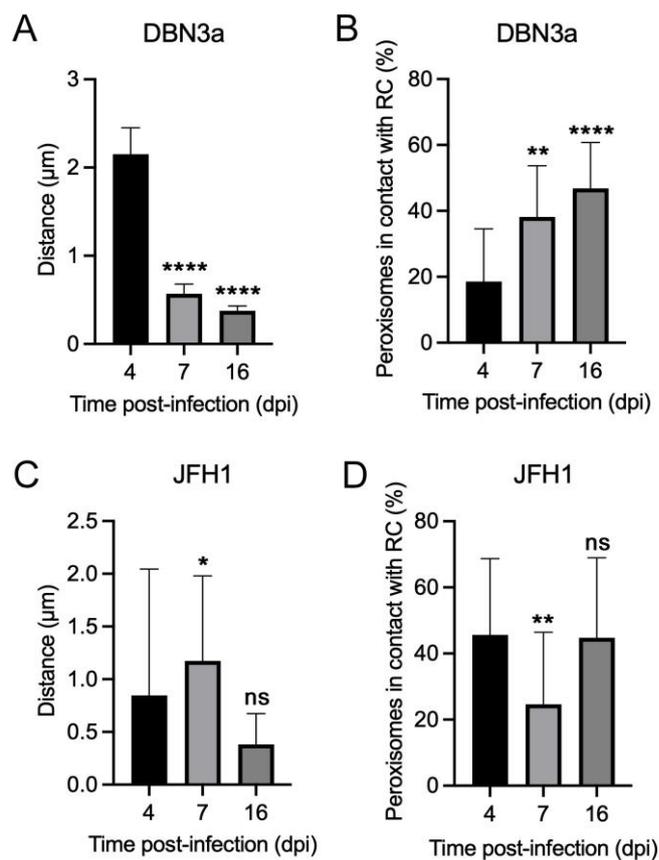


Figure 45 : cinétique d'association des peroxysomes avec les complexes de réplication d'HCV. Des cellules Huh-7 ont été infectées avec la souche DBN3a (A-B) ou JFH1 (C-D), immunomarquées (NS5A/PEX14), imagées au microscope confocal à super-résolution puis analysées sur le logiciel Imaris. (A-C) Distance moyenne entre chaque peroxysome et le complexe de réplication le plus proche à 4, 7 et 16 jours post-infection. (B-D) Pourcentage de peroxysomes en contact avec au moins un complexe de réplication à différents temps post-infection. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Les données ont été analysées statistiquement avec un test de Kruskal-Wallis sur trente cellules par condition.

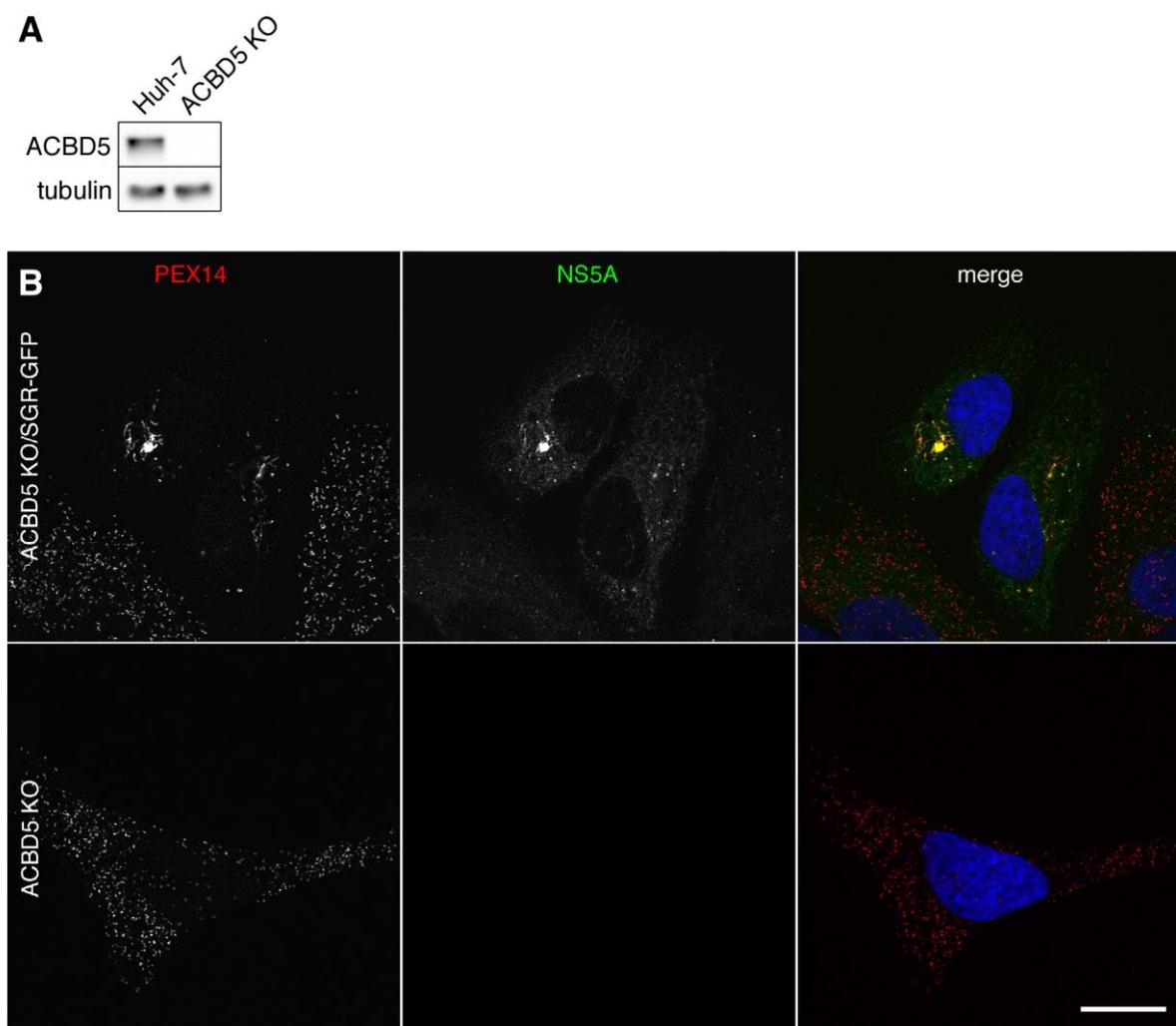


Figure 46 : recrutement des peroxysomes à proximité des complexes de réplication d’HCV dans les cellules ACBD5-KO. (A) Analyse par westernblot de l’expression d’ACBD5 dans les cellules Huh-7 ACBD5-KO. (B) Des cellules Huh-7 ACBD5-KO contrôles (panel du bas) ou contenant un réplicon (panel du haut) ont été immunomarquées avec des anticorps anti-PEX14 (en rouge) et anti-NS5A (en vert). Les noyaux (en bleu) ont été marqués au DAPI.

Le virus de l’hépatite C altère la morphologie des peroxysomes

Dans un second temps, nous avons caractérisé les altérations morphologiques constatées au niveau des peroxysomes des cellules Huh-7 contenant un réplicon de souche JFH1 (Figure 47). La population de cellules SGR s’est révélée très hétérogène, seule une fraction des cellules présentaient des peroxysomes anormaux. Parmi celles-ci, deux types d’altérations sont visibles : certaines cellules présentent des peroxysomes ronds mais élargis (Figure 47B), d’autres des peroxysomes tubulaires très allongés, et d’autres encore combinent les deux types de peroxysomes (Figure

47C). Enfin, dans certaines cellules, les peroxysomes colocalisent avec les complexes de réplication d'HCV (Figure 47 C et H), tandis que dans d'autres les compartiments semblent juxtaposés plutôt que vraiment confondus (Figure 47 B et G), d'autres encore ne présentent aucune association entre les compartiments (données non montrées). Par ailleurs, le coefficient de corrélation de Pearson entre NS5A et ACBD5 dans ces cellules s'est révélé plutôt faible (Figure 47F).

Par la suite, nous avons voulu confirmer la présence de ces altérations morphologiques en modèle infectieux. Pour ce faire, des cellules Huh-7 ont été infectées avec les souches JFH1 ou DBN3a et observées à différents temps post-infection. A partir de 7 dpi, la présence de peroxysomes anormaux a été observée dans une partie des cellules infectées par l'une ou l'autre des souches (Figure 48 A-B). Cependant, les peroxysomes tubulaires sont beaucoup moins fréquents dans les cellules infectées que dans les cellules SGR. Le pourcentage de cellules présentant des peroxysomes à la morphologie anormale a ensuite été calculé dans des cellules Huh-7 naïves, comprenant un réplicon (souches JFH1 et DBN3a) ou infectées à 4, 7 et 16 dpi (souches JFH1 et DBN3a) (Figure 48D). Les cellules infectées ne présentant pas ou très peu de structures tubulaires, les peroxysomes de type « tubulaires allongés » et « élargis » ont été traités sans distinction. Après seize jours d'infection avec les souches JFH1 et DBN3a, respectivement 30% et 20% des cellules infectées présentaient des peroxysomes anormaux, tandis que les réplicons des deux souches induisaient environ 30% de cellules aux peroxysomes altérés. Les altérations morphologiques constatées dans ces cellules ont ensuite été quantifiées grâce au logiciel Imaris. Des piles d'image des cellules d'intérêt ont été acquises au microscope confocal à super-résolution afin de reconstituer une image 3D des peroxysomes, nous avons alors eu accès au nombre de peroxysomes par cellule et au volume de chaque organelle. Après 16 jours d'infection, le volume moyen des peroxysomes passe de 0,15 μm^3 (0 dpi) à 0,33-0,35 μm^3 (16 dpi) selon la souche considérée (Figure 48 E). Dans le même temps, le nombre moyen de peroxysomes par cellule a été divisé par deux environ, passant de 547 peroxysomes par cellule en moyenne dans les cellules contrôles à 204 pour la souche JFH1 et 242 pour la souche DBN3a (Figure 48 F).

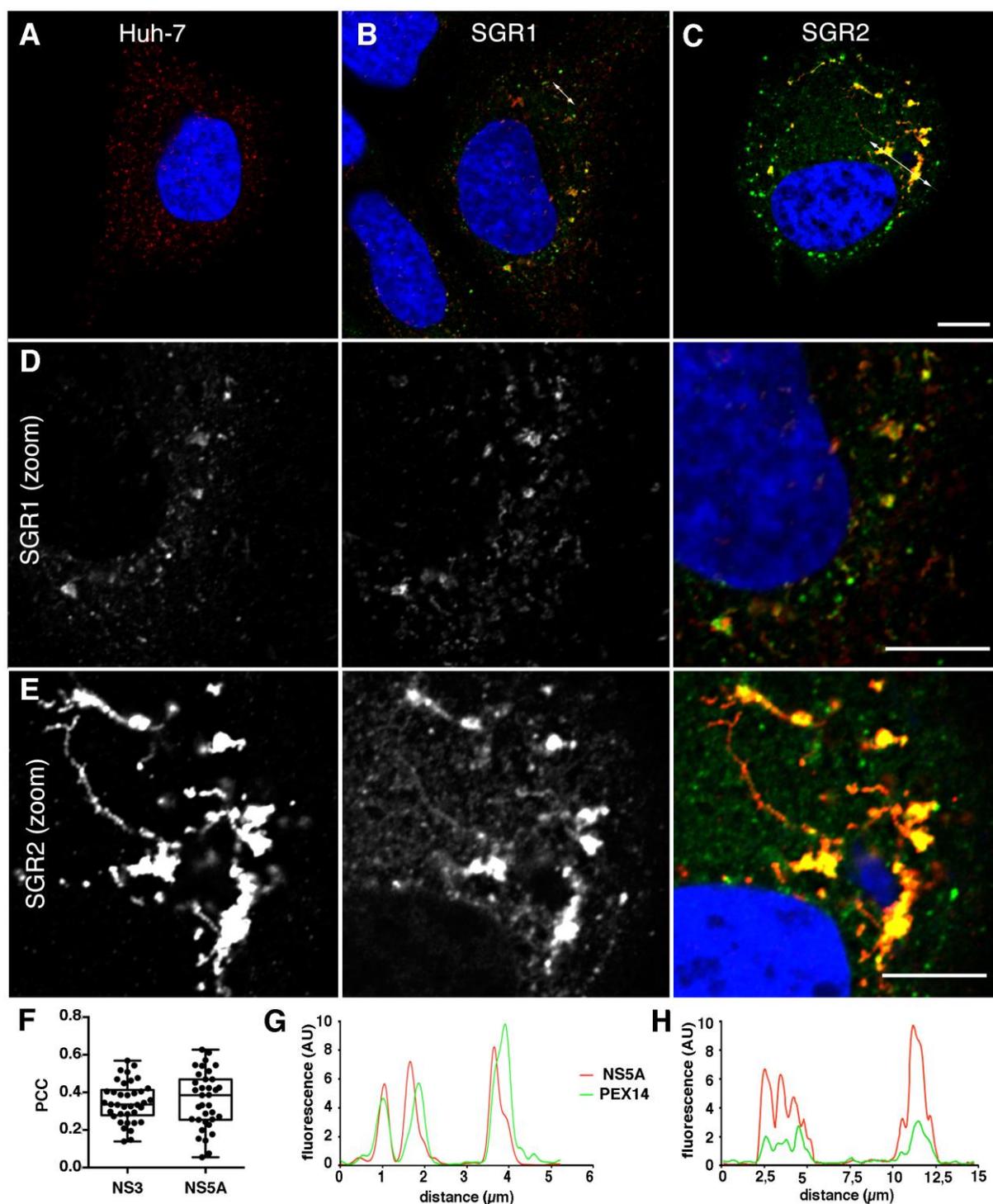


Figure 47: altération de la morphologie et de la localisation subcellulaire des peroxysomes. (A-E) Des cellules Huh-7 contrôles (A) ou contenant un réplicon de souche JFH1 (B-E) ont été immunomarquées avec des anticorps anti-PEX14 (en rouge) et anti-NS5A (en vert). Les noyaux (en bleu) ont été marqués au DAPI. (F) Coefficient de corrélation de Pearson entre le signal ACBD5 et les signaux NS3 et NS5A dans des cellules contenant un réplicon de souche JFH1. Trente cellules ont été analysées. (G-H) Courbe d'intensité de fluorescence. Les segments analysés sont représentés par des flèches sur les images (B) (correspondant au graph (G)) et (C) (correspondant au graph (H)).

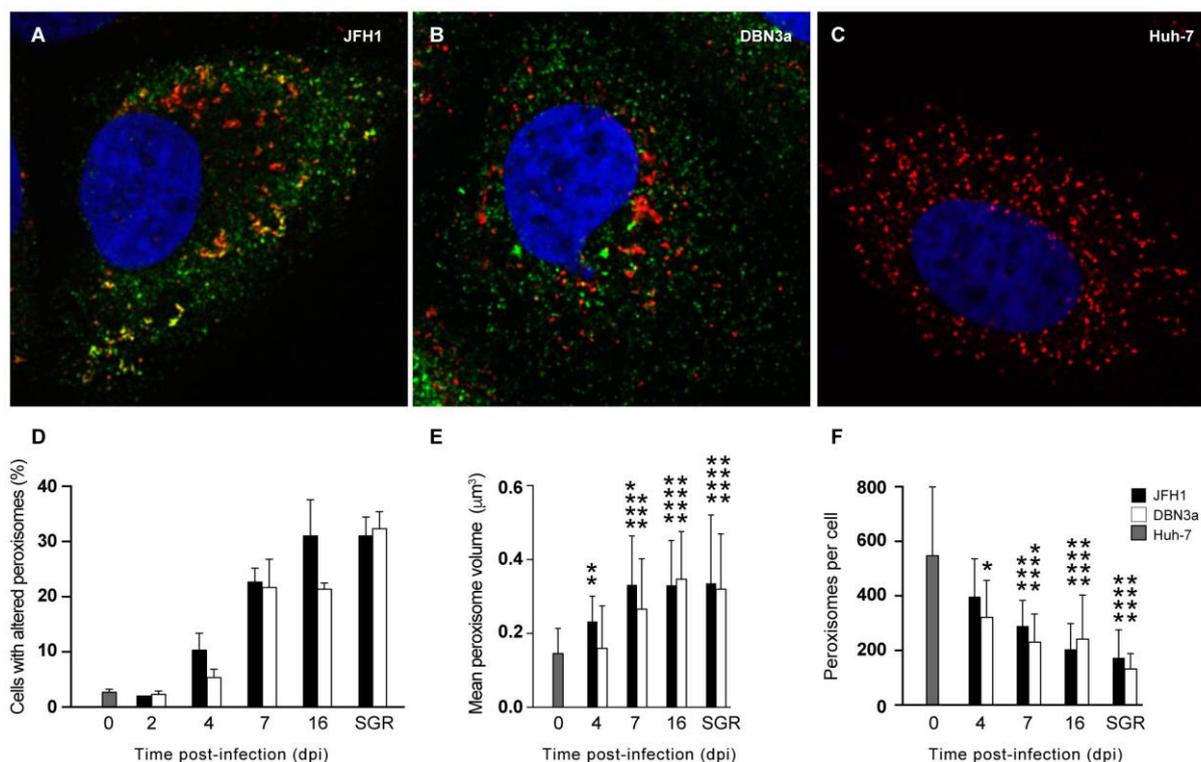


Figure 48 : altération de la morphologie des peroxysomes dans les cellules infectées par HCV ou contenant un réplicon. (A-C) Des cellules Huh-7 contrôles (C) ou infectées par les souches JFH1 (A) et DBN3a (B) à 7 dpi ont été immunomarquées avec des anticorps anti-PEX14 (en rouge) et anti-NS5A (en vert). Les noyaux (en bleu) ont été marqués au DAPI. (D-F) Quantification des altérations morphologiques présentes au niveau des peroxysomes des cellules infectées. (D) Occurrence des cellules présentant des peroxysomes altérés. (E) Volume moyen des peroxysomes. (F) Nombre moyen de peroxysomes par cellule. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Les données ont été analysées statistiquement avec un test de Kruskal-Wallis sur trente cellules par condition.

Impact d'HCV sur l'expression des protéines peroxysomales

Afin d'évaluer si ces altérations morphologiques étaient corrélées à une altération de la biochimie des peroxysomes, nous avons réalisé une analyse des protéines totales de cellules Huh-7 ou contenant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a par spectrométrie de masse (4 réplicats par condition). Au total, 4072 protéines ont été analysées et les niveaux d'expression des protéines détectées dans au moins trois réplicats d'au moins une condition, soit 3768 protéines, ont été conservées pour l'analyse statistique. Parmi ces 3768 protéines, 63 comportaient une annotation GO : peroxysomes. Quatorze protéines ont été identifiées comme différemment

exprimées entre les échantillons Huh-7 contrôles et SGR-JFH1 (Figure 47A) et 97 entre les cellules Huh-7 contrôles et SGR-DBN3a (Figure 47B). Les raisons de cet écart surprenant d'une souche à l'autre sont inconnues. Aucune des protéines différenciellement exprimées n'appartiennent aux protéines peroxysomales. Ces analyses ont été complétées par une analyse multivariée réalisée uniquement sur les protéines peroxysomales (Figure 47C). Cette fois-ci, l'analyse des protéines peroxysomales prises ensemble permettait de séparer les échantillons en deux groupes, d'un côté les cellules contrôles, de l'autre les deux conditions SGR. Ces résultats suggèrent qu'il existe bien une différence d'expression des protéines peroxysomales entre les cellules Huh-7 contrôles ou exprimant un réplicon, mais ces différences sont trop modérées pour ressortir de manière significative. Cela peut s'expliquer par la trop grande variabilité entre les réplicats d'un même échantillon et le trop petit nombre de réplicats analysés.

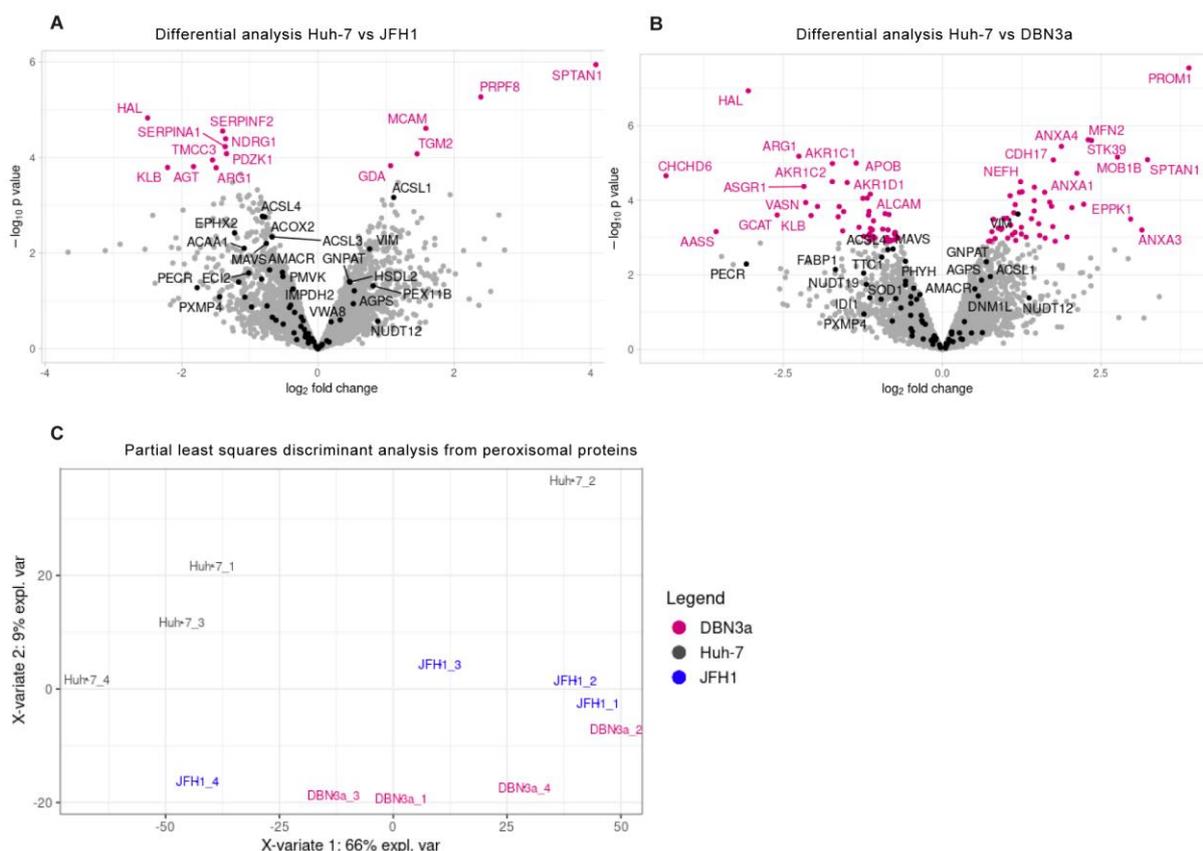


Figure 49 : analyse différentielle de l'expression des protéines totales dans des cellules comprenant un réplicon JFH1 (A) ou DBN3a (B) en comparaison avec des cellules Huh-7 contrôles. Les protéines des lysats cellulaires totaux ont été analysées par LC-MS/MS (4 réplicats par échantillon, 50 µg de protéines par réplicat). Les protéines peroxysomales sont indiquées en noir, les protéines différemment exprimées en rose, les autres protéines en gris. (C) Analyse multivariée de l'expression des protéines peroxysomales par PLS-DA. Les deux groupes discriminés par cette analyse sont composés d'une part des cellules Huh-7 contrôles (en gris) et d'autre part des cellules exprimant un réplicon de souche JFH1 (en bleu) ou DBN3a (en rose).

Les peroxysomes ne sont pas nécessaires au cycle cellulaire d'HCV

Afin d'établir le rôle des peroxysomes dans le cycle cellulaire d'HCV, nous avons généré par CRISPR-Cas9 des lignées cellulaires Huh-7 dépourvues de peroxysomes fonctionnels en inactivant le gène PEX5 (368). PEX5 est la protéine nécessaire à l'import de toutes les protéines matricielles dans la lumière des peroxysomes. En inactivant le gène codant cette protéine, les peroxysomes générés apparaissent comme des structures vides, appelés « ghosts » dans la littérature. Trois lignées ont été générées en utilisant des ARN-guides différents, ainsi que des lignées

contrôles générées sans ARN-guide afin de prendre en compte les effets off-target inhérents à la technique. L'expression résiduelle de PEX5 dans les lignées PEX5-KO a été estimée à environ 5% par westernblot (Figure 50A). Puisque les cellules n'ont pas été clonées après l'inactivation de PEX5, il est attendu qu'une sous-population de celles-ci l'expriment toujours. Nous avons donc évalué le pourcentage de cellules PEX5-KO par immunomarquage avec un anticorps anti-catalase. En effet, PEX5 étant responsable de l'import des protéines matricielles, son inactivation conduit à une relocalisation de l'enzyme dans le cytosol (Figure 50B). Le pourcentage de cellules KO a été estimée à plus de 90% dans les trois populations PEX5-KO (Figure 50C).

Les peroxysomes étant partiellement recrutés à proximité des complexes de réplication d'HCV, nous avons dans un premier temps étudié l'impact de l'absence de peroxysomes fonctionnels sur la réplication virale en utilisant des réplicons de souches JFH1 et DBN3a exprimant une luciférase. Nous avons contrôlé leur réplication par luminescence pendant quatre jours et n'avons observé aucune différence significative entre les lignées PEX5-KO et les cellules contrôles (Figure 50 D-E). Nous avons également titré les particules infectieuses sécrétées par les lignées PEX5-KO. Pour la souche JFH1, les surnageants des cellules infectées ont été titrés à trois jours post-infection (Figure 50F). Pour la souche DBN3a, moins toxique que la souche JFH1 adaptée à la culture cellulaire, les titres ont pu être mesurés jusqu'à seize jours post-infection (Figure 50G). Là encore, l'absence de peroxysomes fonctionnels n'a eu aucun impact significatif sur les titres infectieux. Ces résultats démontrent que des peroxysomes fonctionnels ne sont pas nécessaires à l'établissement de l'infection par HCV.

Pour aller plus loin, nous avons généré des lignées Huh-7 complètement dénuées de peroxysomes en inactivant le gène PEX3 (450). A nouveau, trois lignées ont été générées avec des ARN guides différents et caractérisées de la même manière que les lignées PEX-KO. Cependant, seulement 50% des cellules PEX3-KO présentaient un marquage cytosolique de la catalase, nous avons alors isolé quatre clones PEX3-KO par dilution limite. Comme attendu, l'expression de PEX3 par ces clones était complètement abolie, tandis que l'expression de la catalase (cytosolique dans les cellules PEX3-KO) demeurait inchangée (Figure 51A). Puisque les clones 1.7 et 1.6C ont été isolés de la même population-mère, nous n'avons pas utilisé le clone 1.7 pour la suite de nos expériences. Encore une fois, aucune différence d'efficacité

de réplication (Figure 51 B-C) n'a été constaté dans les cellules dénuées de peroxysomes en comparaison avec les cellules Huh-7 contrôles. A certains temps post-infection, on observe une différence significative entre la sécrétion de particules virales infectieuses entre les cellules Huh-7 contrôles et PEX3-KO 3.2E, mais cette différence n'est pas retrouvée pour les autres clones PEX3-KO (Figure 51 D-E). Nous supposons que cela constitue une différence clonale plutôt qu'un véritable effet de l'absence de peroxysomes.

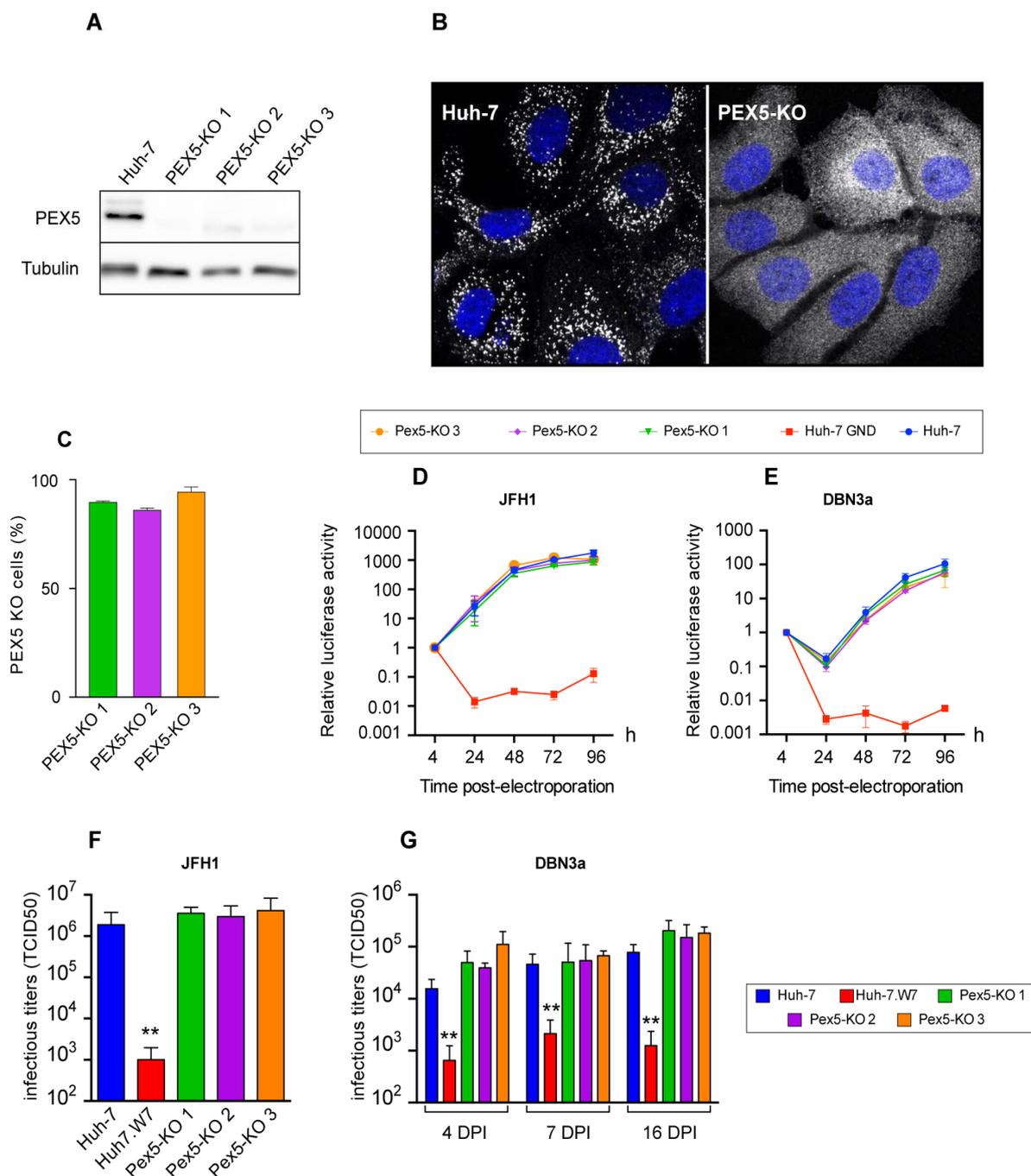


Figure 50 : infection de cellules PEX5-KO par HCV. (A) Analyse par western blot de l'expression de PEX5 dans les cellules Huh-7 contrôles et PEX5-KO. (B) Observation de la localisation subcellulaire de la catalase dans les cellules Huh-7 contrôles et PEX5-KO par immunomarquage. (C) Quantification du pourcentage de cellules PEX5-KO dans les trois populations par immunomarquage anti-catalase. (D-E) Des cellules Huh-7 contrôles ou PEX5-KO ont été électroporées avec un réplicon de souche JFH1 (D) ou DBN3a (E) exprimant la Renilla luciférase ou avec un réplicon non-réplicatif (GND). Les échantillons ont été collectés à 4, 24, 48, 75 et 96 h post-électroporation. Le signal luciférase à 4 h post-électroporation est ramené à 1. Les barres d'erreur expriment la SEM (standard error of the means) pour trois expériences indépendantes réalisées en quadruplicats. (F) Des cellules Huh-7, Huh7.W7 déficientes en CD81 ou PEX5-KO ont été infectées avec la souche JFH1 (MOI = 0,1) et cultivées pendant trois jours. Les surnageants ont ensuite été titrés par la méthode TCID50.

(G) Des cellules Huh-7, Huh7.W7 et PEX5-KO ont été infectées avec la souche DBN3a (MOI = 0,1), cultivées en flasques et passées à 3, 6 et 15 dpi. A chaque passage, les cellules ont été comptées et $1,5 \cdot 10^5$ cellules ont été plâtées dans 1 mL de milieu DMEM. 24 h plus tard, les surnageants ont été titrés par la méthode TCID50. **, $p < 0.01$. Les données ont été analysées par des tests de Mann-Whitney en comparant un à un chaque condition avec la condition contrôle.

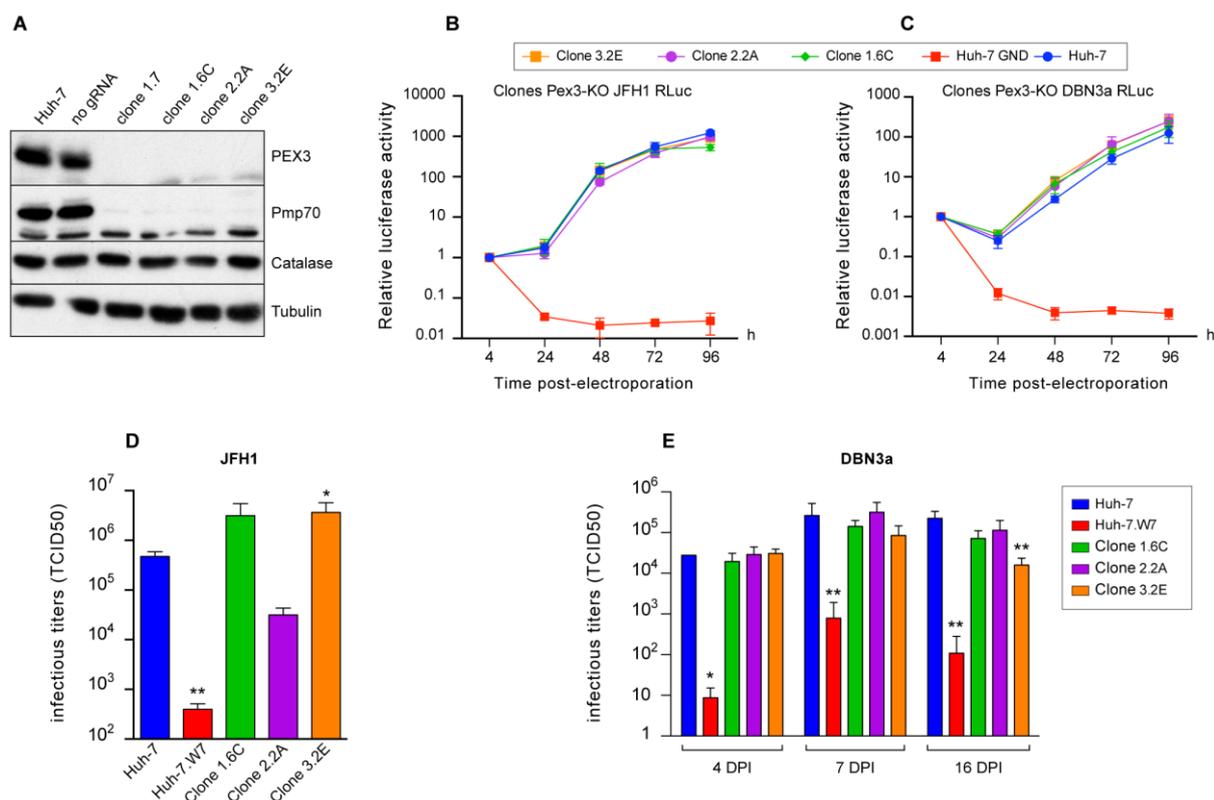


Figure 51 : infection des cellules PEX3-KO par HCV. (A) Analyse par western blot de l'expression de PEX3, PMP70, catalase et tubuline dans les cellules Huh-7 contrôles et les clones Huh-7 PEX3-KO. (B-C) Des cellules Huh-7 contrôles ou PEX3-KO ont été électroporées avec un réplicon de souche JFH1 (D) ou DBN3a (E) exprimant la Renilla luciférase ou avec un réplicon non-réplicatif (GND). Les échantillons ont été collectés à 4, 24, 48, 75 et 96 h post-électroporation. Le signal luciférase à 4 h post-électroporation est ramené à 1. Les barres d'erreur expriment la SEM pour trois expériences indépendantes réalisées en quadruplicats. (D) Des cellules Huh-7, Huh7.W7 déficientes en CD81 ou PEX3-KO ont été infectées avec la souche JFH1 (MOI = 0,1) et cultivées pendant trois jours. Les surnageants ont ensuite été titrés par la méthode TCID50. (E) Des cellules Huh-7, Huh7.W7 et PEX3-KO ont été infectées avec la souche DBN3a (MOI = 0,1), cultivées en flasques et passées à 3, 6 et 15 dpi. A chaque passage, les cellules ont été comptées et $1,5 \cdot 10^5$ cellules ont été plâtées dans 1 mL de milieu DMEM. 24 h plus tard, les surnageants ont été titrés par la méthode TCID50. **, $p < 0.01$. Les données ont été analysées par des tests de Mann-Whitney en comparant un à un chaque condition avec la condition contrôle.

L'infection impacte le fonctionnement des peroxysomes

Les peroxysomes sont des organelles multifonctionnelles dont les principaux rôles consistent à participer au métabolisme des lipides, notamment concernant la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne et maintenir l'équilibre redox de la cellule en détoxifiant les ROS. Chez les patients atteints de troubles du spectre de Zellweger sévère, on détecte une accumulation de VLCFA dans les analyses sanguines, causée par un défaut de β -oxydation peroxysomale. Le calcul du ratio C26/C16 (taux d'acide gras C26:0 divisé par le taux d'acide gras C16:0) est d'ailleurs un des outils diagnostics utilisés en cas de suspicion de ZSD. Afin d'évaluer le fonctionnement de la β -oxydation peroxysomale en présence d'HCV, nous avons réalisé une quantification des acides gras totaux présents dans des cellules Huh-7 contrôles, exprimant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a et PEX3-KO (comme contrôle positif d'un défaut majeur de fonction peroxysomale). Ces analyses ont été réalisées deux fois en quintuplicats sur des culots de 4 millions de cellules. Tandis qu'on observe comme attendu une augmentation significative, quoique faiblement significative, du ratio C26/C16 dans les cellules PEX3-KO, aucune différence n'a pu être constatée entre les cellules Huh-7 contrôles ou exprimant un réplicon (Figure 52).

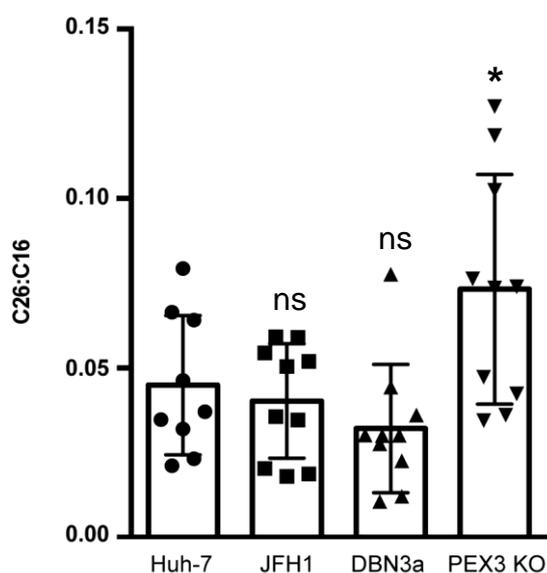


Figure 52 : ratio C26/C16 dans des cellules Huh-7 contrôles, exprimant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a, et PEX3-KO. Deux expériences indépendantes ont été réalisées en quintuplicats sur des culots de 4 millions de cellules. Les acides gras totaux ont été extraits et hydrolysés, puis analysés par LC-MS/MS. *, $p < 0.05$. Les données ont ensuite été statistiquement analysées par ANOVA à un facteur.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact potentiel d'HCV sur la régulation des ROS par les peroxysomes. Pour ce faire, des cellules Huh-7 contrôles ou exprimant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a ont été transfectées avec des plasmides exprimant différentes constructions de roGFP2, adressées respectivement aux peroxysomes peroxysomes (Figure 53A), aux mitochondries (Figure 53B) ou au cytoplasme (Figure 53C). La protéine roGFP2 présente un pont disulfure entre les cystéines entre position 147 et 204. En fonction du contexte redox, ce pont disulfure se forme (état oxydé) ou se détache (état réduit). Cela impacte le spectre d'absorption de la protéine, qui ne comporte qu'un pic d'absorption autour de 488 nm dans sa forme réduite, mais deux pics dans sa forme oxydée (405 et 488 nm) (392). En excitant les cellules transfectées avec les différentes constructions roGFP2 avec un laser à 405 nm puis à 488 nm et en récoltant séquentiellement le signal émis après chaque excitation, il est possible de calculer le ratio d'intensité de fluorescence 405/488. Le calcul de ce ratio permet une mesure relative du stress oxydatif dans les différents compartiments étudiés. On observe alors une augmentation significative du stress oxydatif spécifiquement dans les peroxysomes des cellules exprimant un réplicon (Figure 53D), ce qu'on ne retrouve pas dans leur cytoplasme (Figure 53F), et très peu dans les mitochondries (Figure 53E, uniquement avec la souche JFH1). De plus, l'activité de la catalase, principale enzyme de détoxification des ROS dans les peroxysomes, est diminuée dans les cellules exprimant un réplicon de souche DBN3a (Figure 53G). Cette diminution de l'activité de la catalase, qui peut expliquer l'augmentation du stress oxydatif peroxysomal, n'est pas corrélée avec une diminution de son expression (Figure 53H).

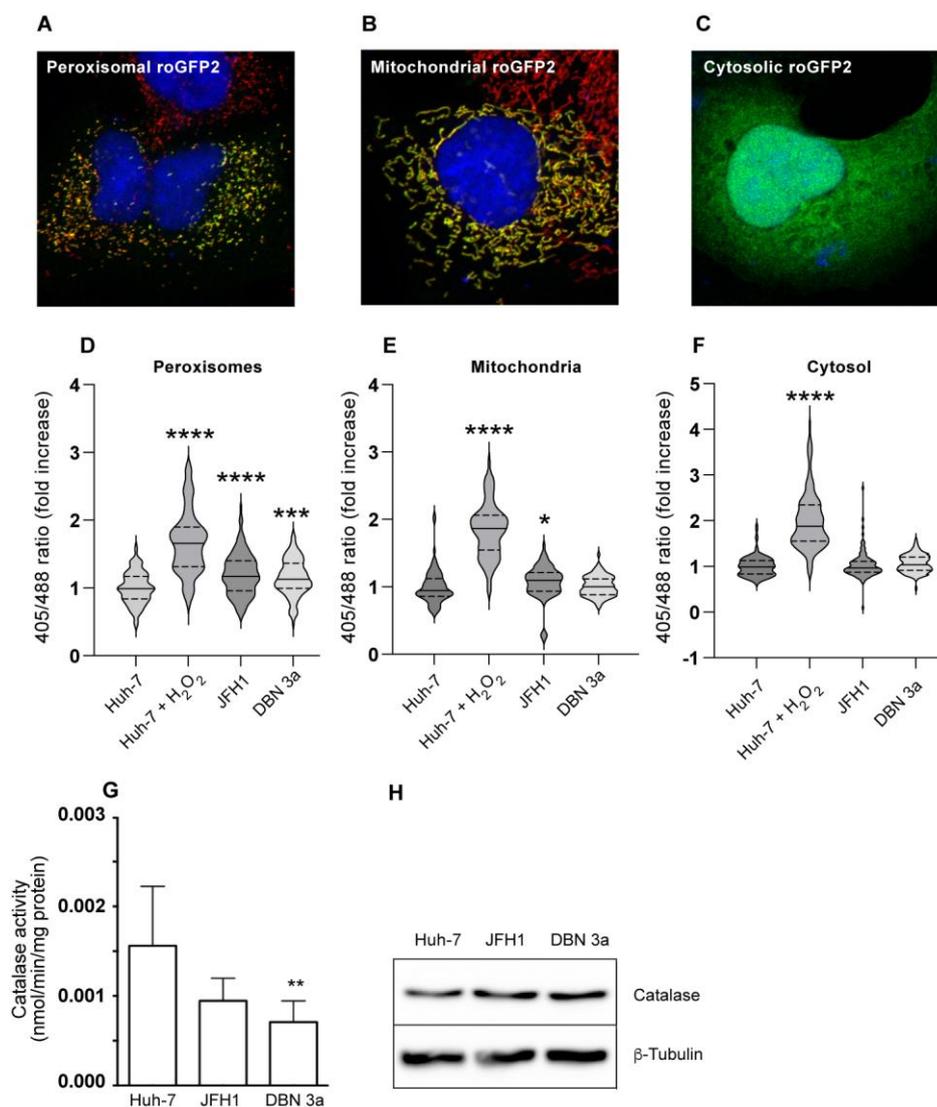


Figure 53 : augmentation du stress oxydatif en présence d'HCV. (A) Fluorescence de la construction roGFP2 peroxysomale (en vert) transfectée dans des cellules Huh-7 co-marquées avec PEX14 (en rouge). (B) Fluorescence de la construction roGFP2 mitochondriale (en vert) transfectée dans des cellules Huh-7 co-marquées avec TOM20 (en rouge). (C) Fluorescence de la construction roGFP2 cytosolique (en vert) transfectée dans des cellules Huh-7. (D-F) Mesure relative de l'état d'oxydation des constructions roGFP2 dans des cellules Huh-7 contrôles et contenant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a transfectées avec une construction roGFP peroxysomale (D), mitochondriale (E) ou cytosolique (F). De l'H₂O₂ a été ajoutée au surnageant de cellules Huh-7 contrôles comme contrôle positif. Les images de cellules vivantes ont été acquises au microscope confocal (37°C, 5% de CO₂) afin de calculer le ratio d'intensité de fluorescence 405/488. Au minimum 90 cellules issues de trois expériences indépendantes ont été analysées pour chaque condition. La valeur des ratios est présentée sous forme de violin plots, sur lesquels la médiane et les quartiles apparaissent respectivement en traits pleins et pointillés. (G) Activité de l'enzyme catalase dans des lysats de cellules Huh-7 contrôle ou comprenant un réplicon de souche JFH1 ou DBN3a. (H) Western blot présentant l'expression de la catalase dans des cellules Huh-7 contrôles ou exprimant un réplicon JFH1 ou DBN3a. $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Les données ont été statistiquement analysées par un test de Kruskal-Wallis.

Discussion

En tant que parasites intracellulaires stricts, les virus induisent souvent des altérations morphologiques et fonctionnelles de nombreux compartiments de leur cellule-hôte. Dans le cas des virus à ARN positifs, l'établissement des complexes de réplication au sein de réarrangements membranaires induit des altérations d'autant plus importantes. Dans le cas d'HCV, des altérations du RE, des mitochondries et des gouttelettes lipidiques ont déjà été documentées (264). Au cours de ces travaux, nous avons démontré que la morphologie et la fonction des peroxysomes étaient elles aussi perturbées par l'infection. Ces résultats vont dans le sens de deux études multi-omics publiées récemment, qui ont documenté un défaut de fonction peroxysomale dans le foie de patients chroniquement infectés par HCV (288,289).

Suite à un crible basé sur la biotinylation de proximité duquel est ressortie la protéine ACBD5, nous avons découvert le recrutement partiel des peroxysomes à proximité des complexes de réplication du virus et constaté des altérations morphologiques conséquentes. En réalisant la cinétique d'association des peroxysomes aux complexes de réplication, nous avons obtenu des résultats très différents entre les deux souches utilisées : tandis qu'avec la souche DBN3a, on constate un rapprochement progressif des compartiments à travers le temps et une augmentation du pourcentage de peroxysomes en contact avec les complexes de réplication, aucune tendance ne se dégage concernant la souche JFH1. Ce résultat surprenant est difficile à expliquer, mais tient peut-être dans la variabilité du marquage NS5A d'une souche à l'autre. L'étude de la cinétique d'association entre les peroxysomes et les complexes de réplication d'une troisième souche virale permettrait probablement de conclure. Concernant le mécanisme de recrutement des peroxysomes, notre hypothèse de départ reposait sur un rôle déterminant d'ACBD5. ACBD5 interagit avec VAP-A et VAP-B pour permettre la formation de zones de contact membranaire entre les peroxysomes et le RE. Les protéines VAPs étant elles-mêmes recrutées par NS5A et nécessaires à la réplication virale, il était facile d'imaginer un recrutement indirect des peroxysomes via l'interaction entre ACBD5 et les VAPs. Cependant, le recrutement des peroxysomes a été constaté en l'absence d'ACBD5, ce qui suggère soit qu'ACBD5 n'est pas impliquée dans leur recrutement, soit qu'elle n'est pas la seule protéine responsable. Il est en effet possible que l'absence d'ACBD5

soit compensée par une isoforme de la protéine ACBD4, qui assume les mêmes fonctions qu'ACBD5 et interagit elle-aussi avec VAP-B (357), mais cette hypothèse n'a pas été testée.

Nos travaux ont mis en évidence une altération de la morphologie des peroxysomes dans 20 à 30% des cellules infectées à 16 dpi. L'élargissement de peroxysomes sphériques et l'apparition de structures tubulaires allongées ont toutes deux été observées. Les structures tubulaires étant principalement présentes dans les cellules contenant un réplicon plutôt que dans les cellules infectées, il est possible qu'elles soient un *artefact* du système réplicon. Par ailleurs, les cellules exprimant un SGR étant sous pression de sélection permanente, elles ont subi la réplication d'HCV sur des temps plus longs que les cellules infectées, que nous n'avons pas pu conserver au-delà de 16 dpi. Les structures tubulaires pourraient alors constituer une altération plus avancée des peroxysomes, sous l'effet de la chronicité de l'infection. A ce titre, il serait intéressant de compléter nos observations avec un modèle permettant l'étude de la chronicité en système infectieux. Par ailleurs, le changement de morphologie des peroxysomes étant parfois constaté indépendamment de leur recrutement à proximité des complexes de réplication, le moteur de ces altérations morphologiques est à chercher ailleurs. De même, nous n'avons pas trouvé d'explication concernant le fait que seule une partie des cellules infectées présentaient des peroxysomes à la morphologie altérée. Des collègues ont suggéré que cela pourrait être lié à une étape précise du cycle cellulaire, cependant des peroxysomes altérés ont été observés dans des cellules en mitose et hors-mitose.

Nous avons constaté une diminution du nombre de peroxysomes dans les cellules infectées, en accord avec ce qui avait déjà été décrit par Lupberger *et al.* (288). Cependant, la raréfaction des peroxysomes s'accompagne d'une augmentation de leur volume moyen. Ces résultats peuvent être interprétés de différentes manières. Premièrement, l'apparition de peroxysomes sphériques élargis peut être causé par un regroupement de plusieurs petits peroxysomes, qui apparaîtraient au microscope à fluorescence comme une seule entité. L'ultrastructure de ces objets pourrait être observée par microscopie électronique afin de déterminer s'il s'agit de peroxysomes véritablement élargis ou de regroupements de peroxysomes. Contrairement aux peroxysomes de rongeurs, les peroxysomes humains sont dépourvus de cœur cristallin et se présentent comme de simples organelles sphériques à simple

membrane de 0,1 à 1 μm de diamètre, ce qui les rend difficiles à identifier par microscopie électronique. Une observation par CLEM (correlative light and electron microscopy), qui permet la superposition d'un signal fluorescent à l'image acquise au microscope électronique et permet ainsi de facilement repérer les structures d'intérêt, a été tentée mais n'a pas pu aboutir pour cause de problèmes techniques. L'élargissement des peroxysomes peut également être causé par la fusion de peroxysomes fonctionnels avec des vésicules pré-peroxysomales issues du RE ou des mitochondries (293). Une augmentation de la synthèse de ces vésicules pré-peroxysomales pourrait alors expliquer l'augmentation de leur volume. Par ailleurs, un défaut de fission des peroxysomes pourrait expliquer l'apparition de peroxysomes tubulaires, mais pas leur élargissement. Malheureusement, l'impact de l'infection sur la fission des peroxysomes est difficile à évaluer car les peroxysomes partagent leur machinerie de fission (FIS, MFF et DRP1) avec les mitochondries, qui sont elles-mêmes très perturbées par HCV. Enfin, la diminution du nombre de peroxysomes peut être causée par un déséquilibre entre biogenèse et dégradation des peroxysomes. En effet, une augmentation de la pexophagie induirait la diminution du nombre total de peroxysomes et l'élargissement des peroxysomes restants. Chez les levures, les peroxysomes plus volumineux sont plus difficiles à dégrader et nécessitent le recrutement de protéines de l'autophagie dispensables pour la dégradation des petits peroxysomes, en particulier Atg11 et Atg26 (451). Si ce mécanisme est transposable aux cellules animales, alors une induction de l'autophagie, déjà documentée dans le cas d'HCV et pouvant mener à une pexophagie peu spécifique, induirait une diminution du nombre de peroxysomes et une sélection des peroxysomes volumineux. Cependant, cette hypothèse n'explique à priori pas la présence de structures tubulaires allongées. Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas réussi à mettre au point un protocole de quantification de la pexophagie.

De façon surprenante, l'absence de peroxysomes n'a eu aucun impact sur la production de particules virales infectieuses par HCV. L'infection induisant une diminution du nombre de peroxysomes, on aurait pu s'attendre à ce que leur déplétion ait un effet positif sur la production de nouveaux virions, d'autant plus que cette déplétion est constatée dans le cadre de l'infection par plusieurs flavivirus, phylogénétiquement relativement proches d'HCV, dont la protéine de capsid est directement adressée aux peroxysomes (430,431). Cependant, l'hypothèse

dominante est que la déplétion des peroxysomes par les flavivirus viserait à empêcher le déclenchement de la réponse immunitaire innée antivirale, or HCV la contrecarre par un autre mécanisme, en clivant MAVS. En outre, nous avons constaté de façon tout aussi surprenante que l'absence de peroxysomes n'induisait pas à priori de surmortalité dans les cellules infectées par HCV.

En nous intéressant à l'impact d'HCV sur les fonctions peroxysomales, nous n'avons pas constaté d'accumulation de VLCFA dans les cellules exprimant un SGR. Ces résultats sont en désaccord avec deux études récentes portant sur l'analyse de cellules Huh-7.5.1^{dif} infectées avec la souche Jc1 (288) et d'échantillons de patients chroniquement infectés par HCV (289). Nos divergences peuvent s'expliquer de plusieurs manières. D'abord, les échantillons analysés sont différents, il est difficile de comparer des cellules différenciées infectées par une souche adaptée d'HCV à des cellules immortalisées cultivées dans du DMEM supplémenté en généticine et exprimant un SGR. Il est par exemple possible que l'absence de protéines structurales dans les SGR, notamment de core, protéine clé dans la pathogenèse d'HCV et dans la perturbation du métabolisme des lipides, modifie les altérations du métabolisme constaté. Par ailleurs, il est aussi possible que la culture de cellules Huh-7 dans du milieu DMEM ne soit pas le bon support pour mener ces analyses. En effet, compte tenu de la faible significativité obtenue en comparant la condition contrôle au phénotype extrême que représente la condition PEX3-KO et la faiblesse des taux d'acides gras à très longue chaîne dans les culots analysés, une variation subtile des taux de VLCFA a pu passer sous le seuil de détection. La supplémentation du milieu de culture en VLCFA pourrait peut-être permettre d'augmenter les taux de VLCFA intracellulaires et ainsi faire apparaître une différence.

Enfin, nous avons mis en évidence une augmentation significative du stress oxydatif spécifique aux peroxysomes dans les cellules Huh-7 exprimant un SGR, tandis que pas ou peu de différence était constatée entre les cellules contrôles et SGR au niveau du cytosol ou des mitochondries. L'induction de stress oxydatif mitochondrial étant largement établi dans la littérature, le maintien du stress oxydatif mitochondrial à des niveaux quasi-normaux en présence d'un SGR est surprenant. Cela peut s'expliquer par l'absence de la protéine core en système réplicon, core étant la principale protéine responsable de la fuite d'électrons causée par la dépolarisation de la membrane des mitochondries (284). L'utilisation de SGRs permet néanmoins

d'affirmer l'induction d'un stress oxydatif peroxysomal indépendant de core. En outre, nous avons montré que l'activité de la catalase était diminuée dans les cellules exprimant un réplicon, sans que cela s'explique par une diminution de son expression. Ces résultats suggèrent une inhibition de la catalase par une ou plusieurs protéines non-structurales d'HCV. La transfection de cellules Huh-7 avec des plasmides codant chacune des protéines virales pourrait permettre d'établir un début de mécanisme d'induction de ce stress oxydatif peroxysomal.

Dans l'ensemble, ces résultats pourraient être complétés par l'analyse d'échantillons de patients chroniquement infectés par HCV, ce qui permettrait d'étudier la chronicité de l'infection. En effet, nos travaux n'ont pu évaluer l'impact de l'infection que sur les seize premiers jours de l'infection, alors que les patients atteints de l'hépatite C sont souvent diagnostiqués au bout de plusieurs décennies d'infection chronique. L'impact à long terme de l'altération des fonctions peroxysomales dans le contexte de l'hépatite C n'a encore jamais été étudié, mais le lien entre défaut de fonction peroxysomale, stress oxydatif, vieillissement cellulaire et apparition de cancer a déjà été établi dans d'autres contextes (391,392,407,410). Par ailleurs, une diminution de l'activité de la catalase a été constatée dans les cellules constitutives d'hépatocarcinomes (407), mais aucune étude n'a encore établi si la diminution de l'activité de l'enzyme était une cause ou une conséquence de l'apparition de ce type de cancer. Il serait intéressant de déterminer si les défaillances peroxysomales induites par HCV ont un rôle dans l'évolution des atteintes hépatiques et l'apparition d'hépatocarcinome. L'analyse d'échantillons de patients ayant reçu un traitement d'AAV et ayant atteint la SVR pourrait aussi être riche en information. En effet, il a été démontré que le risque de développer un HCC persistait même après la guérison des patients (452), et une autre étude a démontré la conservation d'altérations morphologiques de différentes organelles dans des biopsies de foies de patients ayant été guéris d'une hépatite C chronique, même plusieurs années après leur traitement (264). Etudier la morphologie des peroxysomes dans ces deux types d'échantillons pourrait permettre de mieux comprendre la pathogenèse associée à l'hépatite C chronique, et peut-être un jour d'améliorer le pronostic des anciens malades de l'hépatite C. Dans le contexte actuel, où la démocratisation des traitements antiviraux laisse entrevoir la perspective d'éradication de l'hépatite C, la poursuite de l'étude de sa pathogenèse irréversible reste décisive.

Bibliographie

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV, Zuckerman RBAJ. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *Rev Med Virol.* janv 2001;11(1):3-9.
2. Alter HarveyJ, Holland PaulV, Purcell RobertH, Popper H. TRANSMISSIBLE AGENT IN NON-A, NON-B HEPATITIS. *The Lancet.* mars 1978;311(8062):459-63.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 21 avr 1989;244(4902):359-62.
4. Global Burden Of Hepatitis C Working Group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol.* janv 2004;44(1):20-9.
5. Gomaa A, Allam N, Elsharkway A, El Kassas M, Waked I. Hepatitis C infection in Egypt: prevalence, impact and management strategies. *Hepatic Med Evid Res.* 15 mai 2017;9:17-25.
6. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 1 janv 2008;48(1):148-62.
7. Guntipalli P, Pakala R, Kumari Gara S, Ahmed F, Bhatnagar A, Endaya Coronel MK, et al. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastro Enterol Belg.* déc 2021;84(4):633-52.
8. Principaux repères sur l'hépatite C [Internet]. [cité 16 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
9. FR313.pdf [Internet]. [cité 2 mai 2023]. Disponible sur: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR313/FR313.pdf>
10. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, et al. Sexual Transmission of Hepatitis C Virus Among Monogamous Heterosexual Couples: The HCV Partners Study. *Hepatol Baltim Md.* mars 2013;57(3):881-9.
11. Nijmeijer BM, Koopsen J, Schinkel J, Prins M, Geijtenbeek TB. Sexually transmitted hepatitis C virus infections: current trends, and recent advances in understanding the spread in men who have sex with men. *J Int AIDS Soc.* 2019;22(S6):e25348.
12. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 sept 2014;59(6):765-73.
13. Fauteux-Daniel S, Larouche A, Calderon V, Boulais J, Béland C, Ransy DG, et al. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Variable Transmission Bottleneck and Evidence of Midgestation In Utero Infection. *J Virol.* 14 nov 2017;91(23):e01372-17.
14. Chilaka VN, Konje JC. Viral Hepatitis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1 janv 2021;256:287-96.

15. Lingala S, Ghany MG. NATURAL HISTORY OF HEPATITIS C. *Gastroenterol Clin North Am.* déc 2015;44(4):717.
16. Westbrook RH. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61.
17. Kuna L, Jakab J, Smolic R, Wu GY, Smolic M. HCV Extrahepatic Manifestations. *J Clin Transl Hepatol.* 28 juin 2019;7(2):172-82.
18. Dhingra S, Ward SC, Thung SN. Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J Gastroenterol.* 28 janv 2016;22(4):1357-66.
19. Zeremski M, Dimova RB, Pillardy J, de Jong YP, Jacobson IM, Talal AH. Fibrosis Progression in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis.* 15 oct 2016;214(8):1164-70.
20. Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, et al. Relationship Between Steatosis, Inflammation, and Fibrosis in Chronic Hepatitis C: A Meta-Analysis of Individual Patient Data. *Gastroenterology.* 1 mai 2006;130(6):1636-42.
21. Lunel F, Musset L. Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *J Hepatol.* nov 1998;29(5):848-55.
22. Pawlotsky JM, Yahia MB, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: A prospective case-control study. *Hepatology.* 1994;19(4):841-8.
23. Gobran ST, Ancuta P, Shoukry NH. A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection. *Front Immunol.* 12 août 2021;12:726419.
24. Fierer DS, Uriel AJ, Carriero DC, Klepper A, Dieterich DT, Mullen MP, et al. Liver Fibrosis during an Outbreak of Acute Hepatitis C Virus Infection in HIV-Infected Men: A Prospective Cohort Study. *J Infect Dis.* 1 sept 2008;198(5):683-6.
25. Fierer DS, Mullen MP, Dieterich DT, Isabel Fiel M, Branch AD. Early-Onset Liver Fibrosis Due to Primary Hepatitis C Virus Infection Is Higher Over Time in HIV-Infected Men. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 sept 2012;55(6):887-8.
26. Fierer DS, Dieterich DT, Fiel MI, Branch AD, Marks KM, Fusco DN, et al. Rapid Progression to Decompensated Cirrhosis, Liver Transplant, and Death in HIV-Infected Men After Primary Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 avr 2013;56(7):1038-43.
27. Arends JE, Lieveld FI, Boeijen LL, de Kanter CTMM, van Erpecum KJ, Salmon D, et al. Natural history and treatment of HCV/HIV coinfection: Is it time to change paradigms? *J Hepatol.* nov 2015;63(5):1254-62.
28. Lin W, Wu G, Li S, Weinberg EM, Kumthip K, Peng LF, et al. HIV and HCV Cooperatively Promote Hepatic Fibrogenesis via Induction of Reactive Oxygen Species and NFκB. *J Biol Chem.* 28 janv 2011;286(4):2665-74.
29. Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, Wang C, Ozkok D, Mosoian A, et al. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Infects Human Hepatic Stellate Cells and Promotes Collagen I and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression: Implications for the Pathogenesis of HIV/Hepatitis C Virus-Induced Liver Fibrosis. *Hepatol Baltim Md.* août 2010;52(2):612-22.

30. Mosoian A, Zhang L, Hong F, Cunyat F, Rahman A, Bhalla R, et al. Frontline Science: HIV infection of Kupffer cells results in an amplified proinflammatory response to LPS. *J Leukoc Biol.* mai 2017;101(5):1083-90.
31. Sagnelli E, Sagnelli C, Macera M, Pisaturo M, Coppola N. An update on the treatment options for HBV/HCV coinfection. *Expert Opin Pharmacother.* 2 nov 2017;18(16):1691-702.
32. Wiegand SB, Jaroszewicz J, Potthoff A, Höner Zu Siederdisen C, Maasoumy B, Deterding K, et al. Dominance of hepatitis C virus (HCV) is associated with lower quantitative hepatitis B surface antigen and higher serum interferon- γ -induced protein 10 levels in HBV/HCV-coinfected patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2015;21(7):710.e1-9.
33. Mavilia MG, Wu GY. HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation. *J Clin Transl Hepatol.* 28 sept 2018;6(3):296-305.
34. Abdelaal R, Yanny B, El Kabany M. HBV/HCV Coinfection in the Era of HCV-DAAs. *Clin Liver Dis.* août 2019;23(3):463-72.
35. Konstantinou D, Deutsch M. The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol.* juin 2015;28(2):221.
36. Chiamonte M, Stroffolini T, Vian A, Stazi MA, Floreani A, Lorenzoni U, et al. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer.* 15 mai 1999;85(10):2132-7.
37. Peters MG, Terrault NA. Alcohol Use and Hepatitis C. *Hepatology Baltim Md.* nov 2002;36(5 1):S220-5.
38. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet.* 22 mars 1997;349(9055):825-32.
39. Sobhanimonfared F, Bamdad T, Roohvand F. Cross talk between alcohol-induced oxidative stress and HCV replication. *Arch Microbiol.* sept 2020;202(7):1889-98.
40. Butt AA, Yan P, Aslam S, Shaikh OS, Abou-Samra AB. Hepatitis C Virus (HCV) Treatment With Directly Acting Agents Reduces the Risk of Incident Diabetes: Results From Electronically Retrieved Cohort of HCV Infected Veterans (ERCHIVES). *Clin Infect Dis.* 3 mars 2020;70(6):1153-60.
41. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology.* févr 2008;134(2):416-23.
42. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Ito M, Sumie S, et al. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol.* mars 2007;102(3):570-6.
43. Ding Y, Li G, Zhou Z, Deng T. Molecular mechanisms underlying hepatitis C virus infection-related diabetes. *Metabolism.* 1 août 2021;121:154802.

44. Dyal HK, Aguilar M, Bhuket T, Liu B, Holt EW, Torres S, et al. Concurrent Obesity, Diabetes, and Steatosis Increase Risk of Advanced Fibrosis Among HCV Patients: A Systematic Review. *Dig Dis Sci.* sept 2015;60(9):2813-24.
45. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* Baltim Md. janv 2021;73(Suppl 1):4-13.
46. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol.* nov 2016;97(11):2894-907.
47. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology* Baltim Md. janv 2014;59(1):318-27.
48. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci.* 22 déc 2017;19(1):23.
49. Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL. Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. *J Clin Microbiol.* mars 2015;53(3):967-72.
50. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis.* 20 oct 2018;218(11):1722-9.
51. Hartlage AS, Cullen JM, Kapoor A. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. *Annu Rev Virol.* 29 sept 2016;3(1):53-75.
52. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* Baltim Md. janv 2015;61(1):77-87.
53. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RCA, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, et al. Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. *Virology.* août 1996;222(1):31-42.
54. Sagan SM, Chahal J, Sarnow P. Cis-acting RNA elements in the Hepatitis C virus RNA genome. *Virus Res.* 3 août 2015;206:90-8.
55. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(3):125-42.
56. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, et al. The Native Form and Maturation Process of Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol.* juill 1998;72(7):6048-55.
57. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* 1 août 2002;21(15):3980-8.
58. Gawlik K, Gallay PA. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunol Res.* oct 2014;60(1):1-10.

59. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. *J Virol.* sept 2005;79(17):11353-65.
60. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets *. *J Biol Chem.* 4 août 2006;281(31):22236-47.
61. Sedeño-Monge V, Vallejo-Ruiz V, Sosa-Jurado F, Santos-López G. Polymorphisms in the hepatitis C virus core and its association with development of hepatocellular carcinoma. *J Biosci.* sept 2017;42(3):509-21.
62. Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A Disulfide-Bonded Dimer of the Core Protein of Hepatitis C Virus Is Important for Virus-Like Particle Production. *J Virol.* sept 2010;84(18):9118-27.
63. Kao CC, Yi G, Huang HC. The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Curr Opin Virol.* avr 2016;17:66-73.
64. Benali-Furet NL, Chami M, Houel L, De Giorgi F, Vernejoul F, Lagorce D, et al. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene.* juill 2005;24(31):4921-33.
65. Mani H, Yen JH, Hsu HJ, Chang CC, Liou JW. Hepatitis C virus core protein: Not just a nucleocapsid building block, but an immunity and inflammation modulator. *Tzu Chi Med J.* juin 2022;34(2):139.
66. Vassilaki N, Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem.* 17 oct 2003;278(42):40503-13.
67. Moustafa S, Karakasiliotis I, Mavromara P. Hepatitis C Virus core+1/ARF Protein Modulates the Cyclin D1/pRb Pathway and Promotes Carcinogenesis. *J Virol.* 13 avr 2018;92(9):e02036-17.
68. Vrazas V, Moustafa S, Makridakis M, Karakasiliotis I, Vlahou A, Mavromara P, et al. A Proteomic Approach to Study the Biological Role of Hepatitis C Virus Protein Core+1/ARFP. *Viruses.* 31 juill 2022;14(8):1694.
69. Torrents de la Peña A, Sliepen K, Eshun-Wilson L, Newby ML, Allen JD, Zon I, et al. Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science.* 21 oct 2022;378(6617):263-9.
70. Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1–E2 Heterodimer. In: Tan SL, éditeur. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* [Internet]. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006 [cité 24 mai 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1628/>
71. Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, Montpellier C, et al. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *J Virol.* juill 2005;79(13):8400-9.
72. Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, et al. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.* 17 juin 2002;21(12):2893-902.

73. Falkowska E, Kajumo F, Garcia E, Reinus J, Dragic T. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol.* août 2007;81(15):8072-9.
74. Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, et al. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Incorporated into Infectious Virions. *J Virol.* nov 2010;84(22):11905-15.
75. Helle F, Goffard A, Morel V, Duverlie G, McKeating J, Keck ZY, et al. The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *J Virol.* août 2007;81(15):8101-11.
76. Drummer HE. Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Front Microbiol.* 3 juill 2014;5:329.
77. Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth P, Dwek RA, et al. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 2009;106(31):12712-6.
78. Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science.* 2 juill 1999;285(5424):110-3.
79. Gentsch J, Brohm C, Steinmann E, Friesland M, Menzel N, Vieyres G, et al. Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLoS Pathog.* 2 mai 2013;9(5):e1003355.
80. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol.* août 2007;81(16):8374-83.
81. Sakai A, Claire MSt, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 sept 2003;100(20):11646-51.
82. Shanmugam S, Yi M. Efficiency of E2-p7 Processing Modulates Production of Infectious Hepatitis C Virus. *J Virol.* 15 oct 2013;87(20):11255-66.
83. Alzahrani N, Wu MJ, Sousa CF, Kalinina OV, Welsch C, Yi M. SPCS1-Dependent E2-p7 processing determines HCV Assembly efficiency. *PLoS Pathog.* 7 févr 2022;18(2):e1010310.
84. Atoom AM, Jones DM, Russell RS. Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production. *Virus Res.* 1 sept 2013;176(1):199-210.
85. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol.* déc 1995;69(12):7461-71.
86. Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature.* août 2006;442(7104):831-5.
87. Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mars 2009;106(13):5342-7.
88. Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L, Brohm C, et al. Structural and Functional Characterization of Nonstructural Protein 2 for Its Role in Hepatitis C Virus Assembly. *J Biol Chem.* 17 oct 2008;283(42):28546-62.

89. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *Diamond MS, éditeur. PLoS Pathog.* 16 déc 2010;6(12):e1001233.
90. Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM. Compensatory Mutations in E1, p7, NS2, and NS3 Enhance Yields of Cell Culture-Infectious Intergenotypic Chimeric Hepatitis C Virus. *J Virol.* janv 2007;81(2):629-38.
91. Hwang DR, Lai HY, Chang ML, Hsu JTA, Yeh CT. Emergence of mutation clusters in the HCV genome during sequential viral passages in Sip-L expressing cells. *J Virol Methods.* nov 2005;129(2):170-7.
92. Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus: HCV NS3-4A. *J Viral Hepat.* mai 2011;18(5):305-15.
93. White PW, Llinas-Brunet M, Bös M. 2 Blunting the Swiss Army Knife of Hepatitis C Virus: Inhibitors of NS3/4A Protease. In: King FD, Lawton G, éditeurs. *Progress in Medicinal Chemistry [Internet]. Elsevier; 2006 [cité 29 mai 2023].* p. 65-107. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079646805444021>
94. Lin C, Prágai BM, Grakoui A, Xu J, Rice CM. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol.* déc 1994;68(12):8147-57.
95. Lin C. HCV NS3-4A Serine Protease. In: Tan SL, éditeur. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology [Internet]. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006 [cité 29 mai 2023].* Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1623/>
96. Phan T, Kohlway A, Dimberu P, Pyle AM, Lindenbach BD. The Acidic Domain of Hepatitis C Virus NS4A Contributes to RNA Replication and Virus Particle Assembly. *J Virol.* févr 2011;85(3):1193-204.
97. Roder AE, Vazquez C, Horner SM. The acidic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is required for viral assembly and envelopment through interactions with the viral E1 glycoprotein. *PLoS Pathog.* 7 févr 2019;15(2):e1007163.
98. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon ACM, Ikeda M, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 févr 2005;102(8):2992-7.
99. Ferreira AR, Magalhães AC, Camões F, Gouveia A, Vieira M, Kagan JC, et al. Hepatitis C virus NS3-4A inhibits the peroxisomal MAVS-dependent antiviral signalling response. *J Cell Mol Med.* avr 2016;20(4):750-7.
100. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 déc 2005;102(49):17717-22.
101. Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE. Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. *J Biol Chem.* 23 juill 2010;285(30):22725-31.
102. Huang ZS, Wang CC, Wu HN. HCV NS3 protein helicase domain assists RNA structure conversion. *FEBS Lett.* 2010;584(11):2356-62.

103. Frick DN. The Hepatitis C Virus NS3 Protein: A Model RNA Helicase and Potential Drug Target. *Curr Issues Mol Biol.* janv 2007;9(1):1-20.
104. Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosis WW, Weber PC. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease–helicase. *Structure.* 15 nov 1999;7(11):1353-63.
105. Rai R, Deval J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: Targeting NS4B. *Antiviral Res.* mai 2011;90(2):93-101.
106. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J Virol.* juin 2002;76(12):5974-84.
107. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog.* 6 déc 2012;8(12):e1003056.
108. Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory: Hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *Rev Med Virol.* mars 2010;20(2):117-29.
109. Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C. Protein-Protein Interactions between Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins. *J Virol.* mai 2003;77(9):5401-14.
110. Lindström H, Lundin M, Häggström S, Persson MAA. Mutations of the Hepatitis C virus protein NS4B on either side of the ER membrane affect the efficiency of subgenomic replicons. *Virus Res.* nov 2006;121(2):169-78.
111. Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. Viral and Cellular Determinants of Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *J Virol.* mars 2003;77(5):3007-19.
112. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A Nucleotide Binding Motif in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates HCV RNA Replication. *J Virol.* oct 2004;78(20):11288-95.
113. Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *J Virol.* mars 2009;83(5):2163-77.
114. Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, et al. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology.* 1 sept 2009;391(2):257-64.
115. Lim PJ, Chatterji U, Cordek D, Sharma SD, Garcia-Rivera JA, Cameron CE, et al. Correlation between NS5A Dimerization and Hepatitis C Virus Replication. *J Biol Chem.* août 2012;287(36):30861-73.
116. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein *. *J Biol Chem.* 19 nov 2004;279(47):48576-87.
117. Brass V, Bieck E, Montserret R, Wölk B, Hellings JA, Blum HE, et al. An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A *. *J Biol Chem.* 8 mars 2002;277(10):8130-9.

118. Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MRS, Chen Y, Arnold JJ, et al. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-binding Protein *. *J Biol Chem.* 28 oct 2005;280(43):36417-28.
119. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM. Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J Virol.* févr 2008;82(3):1073-83.
120. Kandangwa M, Liu Q. HCV NS5A hyperphosphorylation is involved in viral translation modulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 nov 2019;520(1):192-7.
121. Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog.* 28 mars 2008;4(3):e1000035.
122. Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, et al. Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J Virol.* juill 2004;78(14):7400-9.
123. Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol.* août 2002;5(4):419-27.
124. Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T, Kobayashi K, et al. Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity *. *J Biol Chem.* 29 mars 2002;277(13):11149-55.
125. Hoffman B, Li Z, Liu Q. Downregulation of viral RNA translation by hepatitis C virus non-structural protein NS5A requires the poly(U/UC) sequence in the 3' UTR. *J Gen Virol.* 2015;96(8):2114-21.
126. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, et al. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. *J Virol.* juill 2014;88(13):7541-55.
127. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathog.* 21 mars 2008;4(3):e1000032.
128. Lan KH, Lan KL, Lee WP, Sheu ML, Chen MY, Lee YL, et al. HCV NS5A inhibits interferon- α signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J Hepatol.* 1 mai 2007;46(5):759-67.
129. Luo G, Hamatake RK, Mathis DM, Racela J, Rigat KL, Lemm J, et al. De Novo Initiation of RNA Synthesis by the RNA-Dependent RNA Polymerase (NS5B) of Hepatitis C Virus. *J Virol.* janv 2000;74(2):851-63.
130. Schult P, Nattermann M, Lauber C, Seitz S, Lohmann V. Evidence for Internal Initiation of RNA Synthesis by the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase NS5B In Cellulo. *J Virol.* 12 sept 2019;93(19):e00525-19.
131. Li HC, Yang CH, Lo SY. Hepatitis C Viral Replication Complex. *Viruses.* 22 mars 2021;13(3):520.
132. Ago H, Adachi T, Yoshida A, Yamamoto M, Habuka N, Yatsunami K, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure.* 15 nov 1999;7(11):1417-26.

133. Bressanelli S, Tomei L, Rey FA, De Francesco R. Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. *J Virol.* avr 2002;76(7):3482-92.
134. Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 nov 1999;96(23):13034-9.
135. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel Insights into Hepatitis C Virus Replication and Persistence. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2004 [cité 6 juin 2023]. p. 71-180. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352704630028>
136. Marascio N, Torti C, Liberto MC, Focà A. Update on different aspects of HCV variability: focus on NS5B polymerase. *BMC Infect Dis.* 5 sept 2014;14(Suppl 5):S1.
137. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, et al. Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. *Mol Cell.* 1 juill 2005;19(1):111-22.
138. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 juin 2013;110(23):9505-10.
139. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol.* juill 2002;76(14):6919-28.
140. Shi G, Suzuki T. Molecular Basis of Encapsidation of Hepatitis C Virus Genome. *Front Microbiol.* 7 mars 2018;9:396.
141. Shimotohno K. HCV Assembly and Egress via Modifications in Host Lipid Metabolic Systems. *Cold Spring Harb Perspect Med.* janv 2021;11(1):a036814.
142. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 1992;181(5):293-300.
143. Thomssen R, Bonk S, Thiele A. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol (Berl).* déc 1993;182(6):329-34.
144. Lavie M, Dubuisson J. Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during virus entry and assembly. *Biochimie.* 1 oct 2017;141:62-9.
145. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol.* 1 oct 2016;65(1):S2-21.
146. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med.* 3 mars 2003;197(5):633-42.
147. Bartosch B, Cosset FL. Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;510:279-93.
148. Ploss A, Evans MJ. Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol.* févr 2012;2(1):14-9.

149. Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, et al. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 mars 2005;102(12):4560-5.
150. Voisset C, Dubuisson J. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell*. 2004;96(6):413-413.
151. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. juill 2005;11(7):791-6.
152. Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient*. *J Med Virol*. 2001;64(3):334-9.
153. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 1 déc 2003;125(6):1808-17.
154. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science*. 22 juill 2005;309(5734):623-6.
155. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 juin 2005;102(26):9294-9.
156. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 mars 2006;103(10):3805-9.
157. Li YP, Ramirez S, Mikkelsen L, Bukh J. Efficient Infectious Cell Culture Systems of the Hepatitis C Virus (HCV) Prototype Strains HCV-1 and H77. *J Virol*. 16 déc 2014;89(1):811-23.
158. Heuss C, Rothhaar P, Burm R, Lee JY, Ralfs P, Haselmann U, et al. A Hepatitis C virus genotype 1b post-transplant isolate with high replication efficiency in cell culture and its adaptation to infectious virus production in vitro and in vivo. *PLoS Pathog*. 28 juin 2022;18(6):e1010472.
159. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, et al. Novel Cell Culture-Adapted Genotype 2a Hepatitis C Virus Infectious Clone. *J Virol*. oct 2012;86(19):10805-20.
160. Ramirez S, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J. Robust HCV Genotype 3a Infectious Cell Culture System Permits Identification of Escape Variants With Resistance to Sofosbuvir. *Gastroenterology*. 1 nov 2016;151(5):973-985.e2.
161. Wakita T. Cell Culture Systems of HCV Using JFH-1 and Other Strains. *Cold Spring Harb Perspect Med*. nov 2019;9(11):a036806.
162. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 25 juill 1997;277(5325):570-4.
163. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 août 1997;94(16):8738-43.

164. Berggren KA, Suzuki S, Ploss A. Animal Models Used in Hepatitis C Virus Research. *Int J Mol Sci.* 29 mai 2020;21(11):3869.
165. Muchmore E, Popper H, Peterson DA, Miller MF, Lieberman HM. Non-A, non-B hepatitis-related hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *J Med Primatol.* 1988;17(5):235-46.
166. Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, et al. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology.* 10 mai 1998;244(2):513-20.
167. Xu X, Chen H, Cao X, Ben K. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *J Gen Virol.* 2007;88(9):2504-12.
168. Vercauteren K, Jong YP de, Meuleman P. HCV animal models and liver disease. *J Hepatol.* 1 nov 2014;61(1):S26-33.
169. Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, et al. Adaptation of Hepatitis C Virus to Mouse CD81 Permits Infection of Mouse Cells in the Absence of Human Entry Factors. *PLoS Pathog.* 1 juill 2010;6(7):e1000978.
170. Frentzen A, Anggakusuma null, Gürlevik E, Hueging K, Knocke S, Ginkel C, et al. Cell entry, efficient RNA replication, and production of infectious hepatitis C virus progeny in mouse liver-derived cells. *Hepatol Baltim Md.* janv 2014;59(1):78-88.
171. Ploss A, Kapoor A. Animal Models of Hepatitis C Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* mai 2020;10(5):a036970.
172. Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, et al. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature.* 8 juin 2011;474(7350):208-11.
173. Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, Labitt RN, Budell WC, Friling T, et al. Completion of the entire hepatitis C virus life-cycle in genetically humanized mice. *Nature.* 12 sept 2013;501(7466):237-41.
174. Galun E, Burakova T, Ketzinel M, Lubin I, Shezen E, Kahana Y, et al. Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *J Infect Dis.* juill 1995;172(1):25-30.
175. Wilson EM, Bial J, Tarlow B, Bial G, Jensen B, Greiner DL, et al. Extensive double humanization of both liver and hematopoiesis in FRGN mice. *Stem Cell Res.* nov 2014;13(3 Pt A):404-12.
176. Washburn ML, Bility MT, Zhang L, Kovalev GI, Buntzman A, Frelinger JA, et al. A Humanized Mouse Model to Study Hepatitis C Virus Infection, Immune Response, and Liver Disease. *Gastroenterology.* avr 2011;140(4):1334-44.
177. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med.* août 2001;7(8):927-33.
178. Woollard DJ, Haqshenas G, Dong X, Pratt BF, Kent SJ, Gowans EJ. Virus-Specific T-Cell Immunity Correlates with Control of GB Virus B Infection in Marmosets. *J Virol.* mars 2008;82(6):3054-60.
179. Pfaender S, Brown RJ, Pietschmann T, Steinmann E. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg Microbes Infect.* mars 2014;3(3):e21.

180. Billerbeck E, Wolfisberg R, Fahnøe U, Xiao JW, Quirk C, Luna JM, et al. Mouse models of acute and chronic hepacivirus infection. *Science*. 14 juill 2017;357(6347):204-8.
181. Trivedi S, Murthy S, Sharma H, Hartlage AS, Kumar A, Gadi S, et al. Viral persistence, liver disease and host response in Hepatitis C-like virus rat model. *Hepatology*. 2018;68(2):435-48.
182. Wolfisberg R, Thorselius CE, Salinas E, Elrod E, Trivedi S, Nielsen L, et al. Neutralization and receptor use of infectious culture-derived rat hepacivirus as a model for HCV. *Hepatology*. nov 2022;76(5):1506-19.
183. Hartlage AS, Murthy S, Kumar A, Trivedi S, Dravid P, Sharma H, et al. Vaccination to prevent T cell subversion can protect against persistent hepacivirus infection. *Nat Commun*. 7 mars 2019;10:1113.
184. Jiang J, Wu X, Tang H, Luo G. Apolipoprotein E Mediates Attachment of Clinical Hepatitis C Virus to Hepatocytes by Binding to Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan Receptors. *PLoS ONE*. 2 juill 2013;8(7):e67982.
185. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 oct 1999;96(22):12766-71.
186. Tréguier Y, Bull-Maurer A, Roingeard P. Apolipoprotein E, a Crucial Cellular Protein in the Lifecycle of Hepatitis Viruses. *Int J Mol Sci*. 27 mars 2022;23(7):3676.
187. Gerold G, Moeller R, Pietschmann T. Hepatitis C Virus Entry: Protein Interactions and Fusion Determinants Governing Productive Hepatocyte Invasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*. févr 2020;10(2):a036830.
188. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. avr 2007;446(7137):801-5.
189. Benedicto I, Molina-Jiménez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, et al. The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection. *J Virol*. août 2009;83(16):8012-20.
190. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*. mai 2011;17(5):589-95.
191. Deffieu MS, Clément CMH, Dorobantu CM, Partiot E, Bare Y, Faklaris O, et al. Occludin stalls HCV particle dynamics apart from hepatocyte tight junctions, promoting virion internalization. *Hepatology*. oct 2022;76(4):1164-79.
192. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 12 févr 2009;457(7231):882-6.
193. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol*. juill 2006;80(14):6964-72.

194. Colpitts CC, Tsai PL, Zeisel MB. Hepatitis C Virus Entry: An Intriguingly Complex and Highly Regulated Process. *Int J Mol Sci.* 18 mars 2020;21(6):2091.
195. Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, et al. Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *J Virol.* avr 2012;86(8):4305-16.
196. Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids.* 1 nov 2011;41(5):1159-63.
197. Kumar A, Rohe TC, Elrod EJ, Khan AG, Dearborn AD, Kissinger R, et al. Regions of hepatitis C virus E2 required for membrane association. *Nat Commun.* 26 janv 2023;14(1):433.
198. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, et al. Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol.* janv 2011;85(1):596-605.
199. Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology.* 2008;47(1):17-24.
200. Zhao F, Zhao T, Deng L, Lv D, Zhang X, Pan X, et al. Visualizing the Essential Role of Complete Virion Assembly Machinery in Efficient Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission by a Viral Infection-Activated Split-Intein-Mediated Reporter System. *J Virol.* 3 janv 2017;91(2):e01720-16.
201. Li HC, Yang CH, Lo SY. Cellular factors involved in the hepatitis C virus life cycle. *World J Gastroenterol.* 28 juill 2021;27(28):4555-81.
202. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Décembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, et al. Short range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe.* 18 oct 2012;12(4):558-70.
203. Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q, de Ruiter PE, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 août 2013;110(32):13109-13.
204. Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G. Exosomes from Hepatitis C Infected Patients Transmit HCV Infection and Contain Replication Competent Viral RNA in Complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog.* 2 oct 2014;10(10):e1004424.
205. Hoffman B, Liu Q. Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int.* 2011;31(10):1449-67.
206. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V. Quantitative Analysis of the Hepatitis C Virus Replication Complex. *J Virol.* nov 2005;79(21):13594-605.
207. Moradpour D, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res.* 1 oct 2003;60(2):103-9.
208. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol.* déc 2020;28(12):1022-33.

209. Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale Jr. M, et al. The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLoS Pathog.* 10 févr 2016;12(2):e1005428.
210. Kong L, Aoyagi H, Yang Z, Ouyang T, Matsuda M, Fujimoto A, et al. Surfeit 4 Contributes to the Replication of Hepatitis C Virus Using Double-Membrane Vesicles. *J Virol.* 6 janv 2020;94(2):e00858-19.
211. Kong L, Fujimoto A, Nakamura M, Aoyagi H, Matsuda M, Watashi K, et al. Prolactin Regulatory Element Binding Protein Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Interaction with NS4B. *J Virol.* 26 févr 2016;90(6):3093-111.
212. Madan V, Paul D, Lohmann V, Bartenschlager R. Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology.* mai 2014;146(5):1361-1372.e1-9.
213. Lee JS, Tabata K, Twu WI, Rahman MS, Kim HS, Yu JB, et al. RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog.* 16 sept 2019;15(9):e1008021.
214. Ferraris P, Blanchard E, Roingard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 9):2230.
215. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 août 2009;106(33):14046-51.
216. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway. *J Biol Chem.* 3 avr 2009;284(14):9237-46.
217. Bley H, Schöbel A, Herker E. Whole Lotta Lipids—From HCV RNA Replication to the Mature Viral Particle. *Int J Mol Sci.* 21 avr 2020;21(8):2888.
218. Reiss S, Harak C, Romero-Brey I, Radujkovic D, Klein R, Ruggieri A, et al. The Lipid Kinase Phosphatidylinositol-4 Kinase III Alpha Regulates the Phosphorylation Status of Hepatitis C Virus NS5A. *PLoS Pathog.* 9 mai 2013;9(5):e1003359.
219. Aizaki H, Lee KJ, Sung VMH, Ishiko H, Lai MMC. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology.* 1 juill 2004;324(2):450-61.
220. Gupta G, Song J. C-Terminal Auto-Regulatory Motif of Hepatitis C Virus NS5B Interacts with Human VAPB-MSP to Form a Dynamic Replication Complex. *PLoS ONE.* 19 janv 2016;11(1):e0147278.
221. Huang JT, Tseng CP, Liao MH, Lu SC, Yeh WZ, Sakamoto N, et al. Hepatitis C Virus Replication Is Modulated by the Interaction of Nonstructural Protein NS5B and Fatty Acid Synthase. *J Virol.* mai 2013;87(9):4994-5004.
222. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MMC. Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *J Virol.* avr 2004;78(7):3480-8.

223. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, et al. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J Virol.* nov 2005;79(21):13473-82.
224. Li HC, Yang CH, Lo SY. Roles of microRNAs in Hepatitis C Virus Replication and Pathogenesis. *Viruses.* 15 août 2022;14(8):1776.
225. Kunden RD, Khan JQ, Ghezelbash S, Wilson JA. The Role of the Liver-Specific microRNA, miRNA-122 in the HCV Replication Cycle. *Int J Mol Sci.* 7 août 2020;21(16):5677.
226. Lindenbach BD. Virion Assembly and Release. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:199-218.
227. Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, et al. MAP-Kinase Regulated Cytosolic Phospholipase A2 Activity Is Essential for Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathog.* 26 juill 2012;8(7):e1002829.
228. Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, et al. Efficient Hepatitis C Virus Particle Formation Requires Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1). *Nat Med.* nov 2010;16(11):1295-8.
229. Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol.* 2007;88(8):2204-13.
230. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* sept 2007;9(9):1089-97.
231. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly *. *J Biol Chem.* 21 déc 2007;282(51):37158-69.
232. Neveu G, Barouch-Bentov R, Ziv-Av A, Gerber D, Jacob Y, Einav S. Identification and Targeting of an Interaction between a Tyrosine Motif within Hepatitis C Virus Core Protein and AP2M1 Essential for Viral Assembly. *PLoS Pathog.* 16 août 2012;8(8):e1002845.
233. Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD. Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly. *PLoS Pathog.* 20 oct 2011;7(10):e1002302.
234. Lee JY, Cortese M, Haselmann U, Tabata K, Romero-Brey I, Funaya C, et al. Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet- Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Rep.* 18 juin 2019;27(12):3602-3617.e5.
235. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* oct 1994;68(10):6147-60.
236. Dubuisson J, Rice CM. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol.* févr 1996;70(2):778-86.
237. Selby MJ, Glazer E, Masiarz F, Houghton M. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology.* oct 1994;204(1):114-22.

238. Phan T, Beran RKF, Peters C, Lorenz IC, Lindenbach BD. Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J Virol.* sept 2009;83(17):8379-95.
239. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog.* juill 2007;3(7):e103.
240. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *J Virol.* mars 2008;82(5):2120-9.
241. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 avr 2007;104(14):5848-53.
242. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, et al. Amphipathic α -Helices in Apolipoproteins Are Crucial to the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathog.* 11 déc 2014;10(12):e1004534.
243. Boyer A, Dumans A, Beaumont E, Etienne L, Roingeard P, Meunier JC. The Association of Hepatitis C Virus Glycoproteins with Apolipoproteins E and B Early in Assembly Is Conserved in Lipoviral Particles. *J Biol Chem.* 4 juill 2014;289(27):18904-13.
244. Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, Long G, Hiet MS, Mueller B, et al. Apolipoprotein E Likely Contributes to a Maturation Step of Infectious Hepatitis C Virus Particles and Interacts with Viral Envelope Glycoproteins. *J Virol.* nov 2014;88(21):12422-37.
245. Rossi E, Adams L, Prins A, Bulsara M, de Boer B, Garas G, et al. Validation of the FibroTest Biochemical Markers Score in Assessing Liver Fibrosis in Hepatitis C Patients. *Clin Chem.* 1 mars 2003;49(3):450-4.
246. Trabut JB, Thépot V, Terris B, Sogni P, Nalpas B, Pol S. Évaluation pronostique de la maladie alcoolique du foie : comment et pourquoi ? *Presse Médicale.* 1 févr 2014;43(2):124-34.
247. Bedossa P. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. 1996;24(2).
248. Centre Hépatobiliaire Paul Brousse [Internet]. 2014 [cité 2 mai 2023]. Les traitements de l'Hépatite C chronique. Disponible sur: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/hepatites-virales/hepatite-c/traitement-hepatite-c.html>
249. Spengler U. Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol Ther.* 1 mars 2018;183:118-26.
250. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol.* juill 2013;11(7):482-96.
251. Carter W, Connelly S, Struble K. Reinventing HCV Treatment: Past and Future Perspectives. *J Clin Pharmacol.* 2017;57(3):287-96.
252. Sarrazin C, Isakov V, Svarovskaia E, Hedskog C, Martin R, Chodavarapu K, et al. Late relapse versus HCV reinfection in patients with sustained virologic response after sofosbuvir-based therapies. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 janv 2017;64(1):44-52.

253. Grebely J, Prins M, Hellard M, Cox AL, Osburn WO, Lauer G, et al. Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis*. mai 2012;12(5):408-14.
254. Honegger J, Zhou Y, Walker C. Will There Be a Vaccine to Prevent HCV Infection? *Semin Liver Dis*. 29 avr 2014;34(01):079-88.
255. Traitement de l'hépatite C [Internet]. [cité 30 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/hepatite-c/traitement-medical>
256. VF-INTERACTIF-RECO-VHC-AFEF-v2103.pdf [Internet]. [cité 30 juin 2023]. Disponible sur: <https://afef.asso.fr/wp-content/uploads/2018/06/VF-INTERACTIF-RECO-VHC-AFEF-v2103.pdf>
257. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, et al. Lack of Protective Immunity Against Reinfection with Hepatitis C Virus. *Science*. 2 oct 1992;258(5079):135-40.
258. Duncan JD, Urbanowicz RA, Tarr AW, Ball JK. Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. *Vaccines*. mars 2020;8(1):90.
259. Wasilewski LN, El-Diwany R, Munshaw S, Snider AE, Brady JK, Osburn WO, et al. A Hepatitis C Virus Envelope Polymorphism Confers Resistance to Neutralization by Polyclonal Sera and Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies. *J Virol*. 11 mars 2016;90(7):3773-82.
260. Augestad EH, Castelli M, Clementi N, Ströh LJ, Krey T, Burioni R, et al. Global and local envelope protein dynamics of hepatitis C virus determine broad antibody sensitivity. *Sci Adv*. 26 août 2020;6(35):eabb5938.
261. Augestad EH, Bukh J, Prentoe J. Hepatitis C virus envelope protein dynamics and the link to hypervariable region 1. *Curr Opin Virol*. 1 oct 2021;50:69-75.
262. Swadling L, Capone S, Antrobus RD, Brown A, Richardson R, Newell EW, et al. A Human Vaccine Strategy Based On Chimpanzee Adenoviral and MVA Vectors That Primes, Boosts and Sustains Functional HCV Specific T-Cell Memory. *Sci Transl Med*. 5 nov 2014;6(261):261ra153.
263. Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med*. févr 2006;12(2):190-7.
264. Aoyagi H, Iijima H, Gaber ES, Zaitso T, Matsuda M, Wakae K, et al. Hepatocellular organellar abnormalities following elimination of hepatitis C virus. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 13 juin 2023;
265. Song S, Gong S, Singh P, Lyu J, Bai Y. The interaction between mitochondria and oncoviruses. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. févr 2018;1864(2):481-7.
266. Barbaro G, Di Lorenzo G, Asti A, Ribersani M, Belloni G, Grisorio B, et al. Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings. *Am J Gastroenterol*. 1 août 1999;94(8):2198-205.
267. Chu JYK, Ou J hsiung J. Autophagy in HCV Replication and Protein Trafficking. *Int J Mol Sci*. 22 janv 2021;22(3):1089.

268. Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB, Ray R. Hepatitis C Virus Genotype 1a Growth and Induction of Autophagy. *J Virol.* mars 2008;82(5):2241-9.
269. Sir D, Chen W ling, Choi J, Wakita T, Yen TSB, Ou J hsiung J. Induction of Incomplete Autophagic Response by Hepatitis C Virus via the Unfolded Protein Response. *Hepatol Baltim Md.* oct 2008;48(4):1054-61.
270. Medvedev R, Ploen D, Spengler C, Elgner F, Ren H, Bunten S, et al. HCV-induced oxidative stress by inhibition of Nrf2 triggers autophagy and favors release of viral particles. *Free Radic Biol Med.* 1 sept 2017;110:300-15.
271. Grégoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, Diaz O, et al. IRGM Is a Common Target of RNA Viruses that Subvert the Autophagy Network. *PLoS Pathog.* 8 déc 2011;7(12):e1002422.
272. Su WC, Chao TC, Huang YL, Weng SC, Jeng KS, Lai MMC. Rab5 and Class III Phosphoinositide 3-Kinase Vps34 Are Involved in Hepatitis C Virus NS4B-Induced Autophagy. *J Virol.* oct 2011;85(20):10561-71.
273. Wang L, Tian Y, Ou J hsiung J. HCV Induces the Expression of Rubicon and UVRAG to Temporally Regulate the Maturation of Autophagosomes and Viral Replication. *PLoS Pathog.* 25 mars 2015;11(3):e1004764.
274. Elgretli W, Chen T, Kronfli N, Sebastiani G. Hepatitis C Virus-Lipid Interplay: Pathogenesis and Clinical Impact. *Biomedicines.* 19 janv 2023;11(2):271.
275. El-Kassas M, Awad A. Metabolic aspects of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.* 14 juin 2022;28(22):2429-36.
276. Serfaty L. Metabolic Manifestations of Hepatitis C Virus: Diabetes Mellitus, Dyslipidemia. *Clin Liver Dis.* août 2017;21(3):475-86.
277. Pekow JR, Bhan AK, Zheng H, Chung RT. Hepatic steatosis is associated with increased frequency of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *Cancer.* 2007;109(12):2490-6.
278. Amako Y, Munakata T, Kohara M, Siddiqui A, Peers C, Harris M. Hepatitis C Virus Attenuates Mitochondrial Lipid β -Oxidation by Downregulating Mitochondrial Trifunctional-Protein Expression. *J Virol.* 11 févr 2015;89(8):4092-101.
279. Hu T, Wang J, Li W, Liu M, Han N, Yuan M, et al. Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection. *Viruses.* 25 nov 2022;14(12):2630.
280. Ríos-Ocampo WA, Navas MC, Faber KN, Daemen T, Moshage H. The cellular stress response in hepatitis C virus infection: A balancing act to promote viral persistence and host cell survival. *Virus Res.* 2 avr 2019;263:1-8.
281. Tardif KD, Mori K, Kaufman RJ, Siddiqui A. Hepatitis C Virus Suppresses the IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response. *J Biol Chem.* 23 avr 2004;279(17):17158-64.
282. Pavio N, Romano PR, Graczyk TM, Feinstone SM, Taylor DR. Protein Synthesis and Endoplasmic Reticulum Stress Can Be Modulated by the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 through the Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase PERK. *J Virol.* mars 2003;77(6):3578-85.

283. Rebbani K, Tsukiyama-Kohara K. HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7425628.
284. Hino K, Nishina S, Sasaki K, Hara Y. Mitochondrial damage and iron metabolic dysregulation in hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med*. 1 mars 2019;133:193-9.
285. Smirnova OA, Ivanova ON, Bartosch B, Valuev-Elliston VT, Mukhtarov F, Kochetkov SN, et al. Hepatitis C Virus NS5A Protein Triggers Oxidative Stress by Inducing NADPH Oxidases 1 and 4 and Cytochrome P450 2E1. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8341937.
286. Seen S. Chronic liver disease and oxidative stress - a narrative review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. sept 2021;15(9):1021-35.
287. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, et al. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 févr 2015;282(3):237-43.
288. Lupberger J, Croonenborghs T, Roca Suarez AA, Van Renne N, Jühling F, Oudot MA, et al. Combined Analysis of Metabolome, Proteomes, and Transcriptomes of HCV-infected Cells and Liver to Identify Pathways Associated With Disease Development. *Gastroenterology*. août 2019;157(2):537-551.e9.
289. Ali RO, Quinn GM, Umarova R, Haddad JA, Zhang GY, Townsend EC, et al. Longitudinal multi-omics analyses of the gut-liver axis reveals metabolic dysregulation in hepatitis C infection and cirrhosis. *Nat Microbiol*. janv 2023;8(1):12-27.
290. De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*. avr 1966;46(2):323-57.
291. Wanders RJA, Baes M, Ribeiro D, Ferdinandusse S, Waterham HR. The physiological functions of human peroxisomes. *Physiol Rev*. 1 janv 2023;103(1):957-1024.
292. Till A, Lakhani R, Burnett SF, Subramani S. Pexophagy: The Selective Degradation of Peroxisomes. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:512721.
293. Farré J, Mahalingam SS, Proietto M, Subramani S. Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Rep*. janv 2019;20(1):e46864.
294. Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol*. 2 févr 1995;128(4):509-23.
295. Castro IG, Richards DM, Metz J, Costello JL, Passmore JB, Schrader TA, et al. A role for Mitochondrial Rho GTPase 1 (MIRO1) in motility and membrane dynamics of peroxisomes. *Traffic Cph Den*. mars 2018;19(3):229-42.
296. Motley AM, Ward GP, Hetteema EH. Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J Cell Sci*. 15 mai 2008;121(Pt 10):1633-40.
297. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2011;18(1):20-6.

298. Li X, Gould SJ. The Dynamin-like GTPase DLP1 Is Essential for Peroxisome Division and Is Recruited to Peroxisomes in Part by PEX11 *. *J Biol Chem.* 9 mai 2003;278(19):17012-20.
299. Mayerhofer PU, Bañó-Polo M, Mingarro I, Johnson AE. Human Peroxin PEX3 Is Co-translationally Integrated into the ER and Exits the ER in Budding Vesicles. *Traffic Cph Den.* févr 2016;17(2):117-30.
300. Yagita Y, Hiromasa T, Fujiki Y. Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. *J Cell Biol.* 4 mars 2013;200(5):651-66.
301. Agrawal G, Joshi S, Subramani S. Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 mai 2011;108(22):9113.
302. Muntau AC, Mayerhofer PU, Paton BC, Kammerer S, Roscher AA. Defective Peroxisome Membrane Synthesis Due To Mutations in Human PEX3 Causes Zellweger Syndrome, Complementation Group G. *Am J Hum Genet.* 1 oct 2000;67(4):967-75.
303. Honscho M, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. Mutation in PEX16 Is Causal in the Peroxisome-Deficient Zellweger Syndrome of Complementation Group D. *Am J Hum Genet.* 1 déc 1998;63(6):1622-30.
304. Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu Y, Gould SJ. Pex19 Binds Multiple Peroxisomal Membrane Proteins, Is Predominantly Cytoplasmic, and Is Required for Peroxisome Membrane Synthesis. *J Cell Biol.* 6 mars 2000;148(5):931-44.
305. Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ. PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 15 mars 2004;164(6):863-75.
306. Hua R, Gidda SK, Aranovich A, Mullen RT, Kim PK. Multiple Domains in PEX16 Mediate Its Trafficking and Recruitment of Peroxisomal Proteins to the ER. *Traffic.* 2015;16(8):832-52.
307. Hua R, Kim PK. Multiple paths to peroxisomes: Mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 mai 2016;1863(5):881-91.
308. Biermanns M, Gärtner J. Targeting elements in the amino-terminal part direct the human 70-kDa peroxisomal integral membrane protein (PMP70) to peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 juill 2001;285(3):649-55.
309. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 11 juin 2001;153(6):1141-50.
310. Wang X, Unruh MJ, Goodman JM. Discrete targeting signals direct Pmp47 to oleate-induced peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 6 avr 2001;276(14):10897-905.
311. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 5 janv 2004;164(1):57-67.
312. Matsuzaki T, Fujiki Y. The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J Cell Biol.* 29 déc 2008;183(7):1275-86.

313. Gould SJ, Keller GA, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, et al. Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.* janv 1990;9(1):85-90.
314. Chowdhary G, Kataya AR, Lingner T, Reumann S. Non-canonical peroxisome targeting signals: identification of novel PTS1 tripeptides and characterization of enhancer elements by computational permutation analysis. *BMC Plant Biol.* 11 août 2012;12:142.
315. Terlecky SR, Nuttley WM, McCollum D, Sock E, Subramani S. The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *EMBO J.* 1 août 1995;14(15):3627-34.
316. Gatto GJ, Geisbrecht BV, Gould SJ, Berg JM. Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol.* déc 2000;7(12):1091-5.
317. Baker A, Hogg TL, Warriner SL. Peroxisome protein import: a complex journey. *Biochem Soc Trans.* 15 juin 2016;44(3):783-9.
318. Gao Y, Skowrya ML, Feng P, Rapoport TA. Protein import into peroxisomes occurs through a nuclear pore-like phase. *Science.* 16 déc 2022;378(6625):eadf3971.
319. Dias AF, Francisco T, Rodrigues TA, Grou CP, Azevedo JE. The first minutes in the life of a peroxisomal matrix protein. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 mai 2016;1863(5):814-20.
320. Skowrya ML, Rapoport TA. PEX5 translocation into and out of peroxisomes drives matrix protein import. *Mol Cell.* 1 sept 2022;82(17):3209-3225.e7.
321. Tsukamoto T, Hata S, Yokota S, Miura S, Fujiki Y, Hijikata M, et al. Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *J Biol Chem.* 25 févr 1994;269(8):6001-10.
322. Lazarow PB. Chapter 3.1.7. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 déc 2006;1763(12):1599-604.
323. Braverman N, Dodt G, Gould SJ, Valle D. An isoform of pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Hum Mol Genet.* août 1998;7(8):1195-205.
324. Woodward AW, Bartel B. The Arabidopsis Peroxisomal Targeting Signal Type 2 Receptor PEX7 Is Necessary for Peroxisome Function and Dependent on PEX5. *Mol Biol Cell.* févr 2005;16(2):573-83.
325. Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* nov 1991;10(11):3255-62.
326. Rodrigues TA, Alencastre IS, Francisco T, Brites P, Fransen M, Grou CP, et al. A PEX7-Centered Perspective on the Peroxisomal Targeting Signal Type 2-Mediated Protein Import Pathway. *Mol Cell Biol.* août 2014;34(15):2917-28.
327. Huybrechts SJ, Van Veldhoven PP, Brees C, Mannaerts GP, Los GV, Fransen M. Peroxisome Dynamics in Cultured Mammalian Cells. *Traffic.* 2009;10(11):1722-33.

328. Yokota S, Dariush Fahimi H. Degradation of excess peroxisomes in mammalian liver cells by autophagy and other mechanisms. *Histochem Cell Biol.* 1 avr 2009;131(4):455-8.
329. Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, Kim S, et al. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci.* 15 févr 2013;126(Pt 4):939-52.
330. Li J, Wang W. Mechanisms and Functions of Pexophagy in Mammalian Cells. *Cells.* 3 mai 2021;10(5):1094.
331. Law KB, Bronte-Tinkew D, Di Pietro E, Snowden A, Jones RO, Moser A, et al. The peroxisomal AAA ATPase complex prevents pexophagy and development of peroxisome biogenesis disorders. *Autophagy.* 28 févr 2017;13(5):868-84.
332. Zhang J, Tripathi DN, Jing J, Alexander A, Kim J, Powell RT, et al. ATM Functions at the Peroxisome to Induce Pexophagy in Response to ROS. *Nat Cell Biol.* oct 2015;17(10):1259-69.
333. Yamashita S ichi, Abe K, Tatemichi Y, Fujiki Y. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy.* 1 sept 2014;10(9):1549-64.
334. Hara-Kuge S, Fujiki Y. The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. *Exp Cell Res.* 15 nov 2008;314(19):3531-41.
335. Jiang L, Hara-Kuge S, Yamashita S ichi, Fujiki Y. Peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II. *Genes Cells.* 2015;20(1):36-49.
336. Okumoto K, Tamura S, Honsho M, Fujiki Y. Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis. In: Lizard G, éditeur. *Peroxisome Biology: Experimental Models, Peroxisomal Disorders and Neurological Diseases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cité 1 août 2023]. p. 3-17. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_1
337. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem.* 25 oct 1991;266(30):19995-20000.
338. Luthria DL, Mohammed BS, Sprecher H. Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 5 juill 1996;271(27):16020-5.
339. Vaz FrédéricM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 1 août 2017;56:10-24.
340. Lu Q, Zong W, Zhang M, Chen Z, Yang Z. The Overlooked Transformation Mechanisms of VLCFAs: Peroxisomal β -Oxidation. *Agriculture.* juill 2022;12(7):947.
341. Dean JM, Lodhi IJ. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell.* févr 2018;9(2):196-206.
342. Faust PL, Kovacs WJ. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie.* 1 mars 2014;98:75-85.
343. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* juill 1972;128(3):617-30.

344. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 sept 2012;1822(9):1363-73.
345. Okumoto K, El Shermely M, Natsui M, Kosako H, Natsuyama R, Marutani T, et al. The peroxisome counteracts oxidative stresses by suppressing catalase import via Pex14 phosphorylation. *eLife.* 9:e55896.
346. Walton PA, Brees C, Lismont C, Apanasets O, Fransen M. The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 oct 2017;1864(10):1833-43.
347. He A, Dean JM, Lodhi IJ. Peroxisomes as Cellular Adaptors to Metabolic and Environmental Stress. *Trends Cell Biol.* août 2021;31(8):656-70.
348. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell.* 14 mai 2010;141(4):668-81.
349. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 7 juill 2008;205(7):1601-10.
350. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS Forms Functional Prion-Like Aggregates To Activate and Propagate Antiviral Innate Immune Response. *Cell.* 5 août 2011;146(3):448-61.
351. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Fiegen A, et al. Diverse intracellular pathogens activate Type III Interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol.* août 2014;15(8):717-26.
352. Islinger M, Voelkl A, Fahimi HD, Schrader M. The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(5):443-71.
353. Bender S, Reuter A, Eberle F, Einhorn E, Binder M, Bartenschlager R. Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* 20 nov 2015;11(11):e1005264.
354. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature.* 1 juin 2017;546(7656):162-7.
355. Novikoff PM, Novikoff AB. PEROXISOMES IN ABSORPTIVE CELLS OF MAMMALIAN SMALL INTESTINE. *J Cell Biol.* 1 mai 1972;53(2):532-60.
356. Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, et al. ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol.* févr 2017;216(2):331-42.
357. Costello JL, Castro IG, Schrader TA, Islinger M, Schrader M. Peroxisomal ACBD4 interacts with VAPB and promotes ER-peroxisome associations. *Cell Cycle.* 2 mai 2017;16(11):1039-45.

358. Xiao J, Luo J, Hu A, Xiao T, Li M, Kong Z, et al. Cholesterol transport through the peroxisome-ER membrane contacts tethered by PI(4,5)P2 and extended synaptotagmins. *Sci China Life Sci.* sept 2019;62(9):1117-35.
359. Walton PA, Pizzitelli M. Effects of Peroxisomal Catalase Inhibition on Mitochondrial Function. *Front Physiol.* 23 avr 2012;3:108.
360. Peeters A, Shinde AB, Dirx R, Smet J, De Bock K, Espeel M, et al. Mitochondria in peroxisome-deficient hepatocytes exhibit impaired respiration, depleted DNA, and PGC-1 α independent proliferation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 févr 2015;1853(2):285-98.
361. Vickers AEM, Bentley P, Fisher RL. Consequences of mitochondrial injury induced by pharmaceutical fatty acid oxidation inhibitors is characterized in human and rat liver slices. *Toxicol In Vitro.* 1 oct 2006;20(7):1173-82.
362. Rahim RS, Chen M, Nourse CC, Meedeniya ACB, Crane DI. Mitochondrial changes and oxidative stress in a mouse model of Zellweger syndrome neuropathogenesis. *Neuroscience.* 15 oct 2016;334:201-13.
363. Hicks L, Fahimi HD. Peroxisomes (microbodies) in the myocardium of rodents and primates. A comparative Ultrastructural cytochemical study. *Cell Tissue Res.* 4 janv 1977;175(4):467-81.
364. Fan J, Li X, Issop L, Culty M, Papadopoulos V. ACBD2/EC12-Mediated Peroxisome-Mitochondria Interactions in Leydig Cell Steroid Biosynthesis. *Mol Endocrinol.* juill 2016;30(7):763-82.
365. Kustatscher G, Grabowski P, Schrader TA, Passmore JB, Schrader M, Rappsilber J. Co-regulation Map of the Human Proteome Enables Identification of Protein Functions. *Nat Biotechnol.* 1 nov 2019;37(11):1361-71.
366. Schrader M, Kamoshita M, Islinger M. Organelle interplay—peroxisome interactions in health and disease. *J Inherit Metab Dis.* janv 2020;43(1):71-89.
367. Thiam AR, Dugail I. Lipid droplet-membrane contact sites - from protein binding to function. *J Cell Sci.* 17 juin 2019;132(12):jcs230169.
368. Baes M, Gressens P, Baumgart E, Carmeliet P, Casteels M, Franssen M, et al. A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet.* sept 1997;17(1):49-57.
369. Chang CL, Weigel AV, Ioannou MS, Pasolli HA, Xu CS, Peale DR, et al. Spastin tethers lipid droplets to peroxisomes and directs fatty acid trafficking through ESCRT-III. *J Cell Biol.* 5 août 2019;218(8):2583-99.
370. Kong J, Ji Y, Jeon YG, Han JS, Han KH, Lee JH, et al. Spatiotemporal contact between peroxisomes and lipid droplets regulates fasting-induced lipolysis via PEX5. *Nat Commun.* 29 janv 2020;11:578.
371. Chu BB, Liao YC, Qi W, Xie C, Du X, Wang J, et al. Cholesterol Transport through Lysosome-Peroxisome Membrane Contacts. *Cell.* 9 avr 2015;161(2):291-306.
372. Hu A, Zhao XT, Tu H, Xiao T, Fu T, Wang Y, et al. PIP4K2A regulates intracellular cholesterol transport through modulating PI(4,5)P2 homeostasis. *J Lipid Res.* mars 2018;59(3):507-14.

373. Klouwer FCC, Berendse K, Ferdinandusse S, Wanders RJA, Engelen M, Poll-The BT. Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. *Orphanet J Rare Dis.* 1 déc 2015;10:151.
374. Waterham HR, Ebberink MS. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 sept 2012;1822(9):1430-41.
375. Braverman NE, Raymond GV, Rizzo WB, Moser AB, Wilkinson ME, Stone EM, et al. Peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger spectrum: An overview of current diagnosis, clinical manifestations, and treatment guidelines. *Mol Genet Metab.* mars 2016;117(3):313-21.
376. Poll-The BT, Gärtner J. Clinical diagnosis, biochemical findings and MRI spectrum of peroxisomal disorders. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 sept 2012;1822(9):1421-9.
377. Steinberg SJ, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB. Zellweger Spectrum Disorder. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 9 août 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1448/>
378. Berendse K, Engelen M, Linthorst GE, van Trotsenburg AP, Poll-The BT. High prevalence of primary adrenal insufficiency in Zellweger spectrum disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2 sept 2014;9:133.
379. Rush ET, Goodwin JL, Braverman NE, Rizzo WB. Low bone mineral density is a common feature of Zellweger spectrum disorders. *Mol Genet Metab.* janv 2016;117(1):33-7.
380. Berendse K, Engelen M, Ferdinandusse S, Majoie CBLM, Waterham HR, Vaz FM, et al. Zellweger spectrum disorders: clinical manifestations in patients surviving into adulthood. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39:93-106.
381. National Institute of Neurological Disorders and Stroke [Internet]. [cité 9 août 2023]. Zellweger Syndrome. Disponible sur: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/zellweger-syndrome>
382. Moser AB, Jones RO, Hubbard WC, Tortorelli S, Orsini JJ, Caggana M, et al. Newborn Screening for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Int J Neonatal Screen.* déc 2016;2(4):15.
383. Engelen M, Barbier M, Dijkstra IME, Schür R, de Bie RMA, Verhamme C, et al. X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain J Neurol.* mars 2014;137(Pt 3):693-706.
384. Huffnagel IC, Dijkgraaf MGW, Janssens GE, van Weeghel M, van Geel BM, Poll-The BT, et al. Disease progression in women with X-linked adrenoleukodystrophy is slow. *Orphanet J Rare Dis.* 7 févr 2019;14:30.
385. van Geel BM, Bezman L, Loes DJ, Moser HW, Raymond GV. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* févr 2001;49(2):186-94.
386. Huffnagel IC, Laheji FK, Aziz-Bose R, Tritos NA, Marino R, Linthorst GE, et al. The Natural History of Adrenal Insufficiency in X-Linked Adrenoleukodystrophy: An International Collaboration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 janv 2019;104(1):118-26.

387. Marchetti DP, Steffens L, Jacques CE, Guerreiro GB, Mescka CP, Deon M, et al. Oxidative Imbalance, Nitrative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. *Cell Mol Neurobiol.* nov 2018;38(8):1505-16.
388. Turk BR, Theda C, Fatemi A, Moser AB. X-linked adrenoleukodystrophy: Pathology, pathophysiology, diagnostic testing, newborn screening and therapies. *Int J Dev Neurosci.* févr 2020;80(1):52-72.
389. Raymond GV, Moser AB, Fatemi A. X-Linked Adrenoleukodystrophy. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 10 août 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1315/>
390. Waterham HR, Wanders RJ, Leroy BP. Adult Refsum Disease. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 10 août 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1353/>
391. Cipolla CM, Lodhi IJ. Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. *Trends Endocrinol Metab TEM.* avr 2017;28(4):297-308.
392. Ivashchenko O, Van Veldhoven PP, Brees C, Ho YS, Terlecky SR, Fransen M. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Mol Biol Cell.* 1 mai 2011;22(9):1440-51.
393. Legakis JE, Koepke JI, Jedeszko C, Barlaskar F, Terlecky LJ, Edwards HJ, et al. Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts. *Mol Biol Cell.* déc 2002;13(12):4243-55.
394. Narayan V, Ly T, Pourkarimi E, Murillo AB, Gartner A, Lamond AI, et al. Deep Proteome Analysis Identifies Age-Related Processes in *C. elegans*. *Cell Syst.* 24 août 2016;3(2):144-59.
395. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β -cell: the Last Ten Years. *Cell.* 16 mars 2012;148(6):1160-71.
396. Elsner M, Gehrman W, Lenzen S. Peroxisome-Generated Hydrogen Peroxide as Important Mediator of Lipotoxicity in Insulin-Producing Cells. *Diabetes.* janv 2011;60(1):200-8.
397. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, et al. Catalase Deficiency Accelerates Diabetic Renal Injury Through Peroxisomal Dysfunction. *Diabetes.* mars 2012;61(3):728-38.
398. Kim D, Song J, Ahn C, Kang Y, Chun CH, Jin EJ. Peroxisomal dysfunction is associated with up-regulation of apoptotic cell death via miR-223 induction in knee osteoarthritis patients with type 2 diabetes mellitus. *Bone.* juill 2014;64:124-31.
399. Vasko R, Ratliff BB, Bohr S, Nadel E, Chen J, Xavier S, et al. Endothelial Peroxisomal Dysfunction and Impaired Pexophagy Promotes Oxidative Damage in Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury. *Antioxid Redox Signal.* 20 juill 2013;19(3):211-30.
400. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids.* juin 1991;26(6):421-5.

401. Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, et al. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011;122(3):271-83.
402. Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, et al. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 1 oct 2005;115(10):2774-83.
403. Fabelo N, Martín V, Santpere G, Marín R, Torrent L, Ferrer I, et al. Severe Alterations in Lipid Composition of Frontal Cortex Lipid Rafts from Parkinson's Disease and Incidental Parkinson's Disease. *Mol Med*. 2011;17(9-10):1107-18.
404. Jo DS, Park NY, Cho DH. Peroxisome quality control and dysregulated lipid metabolism in neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 11 sept 2020;52(9):1486-95.
405. Lauer C, Völkl A, Riedl S, Fahimi HD, Beier K. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis*. juin 1999;20(6):985-9.
406. Keller JM, Cablé S, el Bouhtoury F, Heusser S, Scotto C, Armbruster L, et al. Peroxisome through cell differentiation and neoplasia. *Biol Cell*. 1993;77(1):77-88.
407. Litwin JA, Beier K, Völkl A, Hofmann WJ, Fahimi HD. Immunocytochemical investigation of catalase and peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes in human hepatocellular tumors and liver cirrhosis. *Virchows Arch Int J Pathol*. nov 1999;435(5):486-95.
408. Frederiks WM, Bosch KS, Hoeben KA, van Marle J, Langbein S. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes. *Acta Histochem*. juill 2010;112(4):364-71.
409. Kim JA. Peroxisome Metabolism in Cancer. *Cells*. 14 juill 2020;9(7):1692.
410. Chen X, Tian M, Sun R, Zhang M, Zhou L, Jin L, et al. SIRT5 inhibits peroxisomal ACOX1 to prevent oxidative damage and is downregulated in liver cancer. *EMBO Rep*. mai 2018;19(5):e45124.
411. Lv J, Lv CQ, Xu L, Yang H. Plasma Content Variation and Correlation of Plasmalogen and GIS, TC, and TPL in Gastric Carcinoma Patients: A Comparative Study. *Med Sci Monit Basic Res*. 17 juill 2015;21:157-60.
412. Benjamin DI, Cozzo A, Ji X, Roberts LS, Louie SM, Mulvihill MM, et al. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 sept 2013;110(37):14912-7.
413. Saito K, Arai E, Maekawa K, Ishikawa M, Fujimoto H, Taguchi R, et al. Lipidomic Signatures and Associated Transcriptomic Profiles of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Sci Rep*. 30 juin 2016;6:28932.
414. Benjamin DI, Cravatt BF, Nomura DK. Global Profiling Strategies for Mapping Dysregulated Metabolic Pathways in Cancer. *Cell Metab*. 7 nov 2012;16(5):565-77.
415. Smith RE, Lespi P, Di Luca M, Bustos C, Marra FA, de Alaniz MJT, et al. A reliable biomarker derived from plasmalogens to evaluate malignancy and metastatic capacity of human cancers. *Lipids*. janv 2008;43(1):79-89.

416. Jain IH, Calvo SE, Markhard AL, Skinner OS, To TL, Ast T, et al. Genetic screen for cell fitness in high or low oxygen highlights mitochondrial and lipid metabolism. *Cell*. 30 avr 2020;181(3):716-727.e11.
417. Ferreira AR, Gouveia A, Magalhães AC, Valença I, Marques M, Kagan JC, et al. Human Cytomegalovirus vMIA Inhibits MAVS Oligomerization at Peroxisomes in an MFF-Dependent Manner. *Front Cell Dev Biol*. 4 avr 2022;10:871977.
418. Wang S, Wang K, Lin R, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Serine/Threonine Kinase US3 Hyperphosphorylates IRF3 and Inhibits Beta Interferon Production. *J Virol*. déc 2013;87(23):12814-27.
419. Xing J, Wang S, Lin R, Mossman KL, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein US11 Downmodulates the RLR Signaling Pathway via Direct Interaction with RIG-I and MDA-5. *J Virol*. avr 2012;86(7):3528-40.
420. Zheng C, Su C. Herpes simplex virus 1 infection dampens the immediate early antiviral innate immunity signaling from peroxisomes by tegument protein VP16. *Viol J*. 21 févr 2017;14:35.
421. Yu K, Tian H, Deng H. PPM1G restricts innate immune signaling mediated by STING and MAVS and is hijacked by KSHV for immune evasion. *Sci Adv*. 20 nov 2020;6(47):eabd0276.
422. Jean Beltran PM, Mathias RA, Cristea IM. A portrait of the human organelle proteome in space and time during cytomegalovirus infection. *Cell Syst*. 26 oct 2016;3(4):361-373.e6.
423. Jean Beltran PM, Cook KC, Hashimoto Y, Galitzine C, Murray LA, Vitek O, et al. Infection-induced peroxisome biogenesis is a metabolic strategy for herpesvirus replication. *Cell Host Microbe*. 10 oct 2018;24(4):526-541.e7.
424. Cook KC, Tsopurashvili E, Needham JM, Thompson SR, Cristea IM. Restructured membrane contacts rewire organelles for human cytomegalovirus infection. *Nat Commun*. 11 août 2022;13:4720.
425. Sychev ZE, Hu A, DiMaio TA, Gitter A, Camp ND, Noble WS, et al. Integrated systems biology analysis of KSHV latent infection reveals viral induction and reliance on peroxisome mediated lipid metabolism. *PLoS Pathog*. 3 mars 2017;13(3):e1006256.
426. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, et al. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe*. 9 déc 2020;28(6):853-866.e5.
427. Knoblach B, Ishida R, Hobman TC, Rachubinski RA. Peroxisomes exhibit compromised structure and matrix protein content in SARS-CoV-2-infected cells. *Mol Biol Cell*. 1 juill 2021;32(14):1273-82.
428. Xu Z, Asahchop EL, Branton WG, Gelman BB, Power C, Hobman TC. MicroRNAs upregulated during HIV infection target peroxisome biogenesis factors: Implications for virus biology, disease mechanisms and neuropathology. *PLoS Pathog*. 8 juin 2017;13(6):e1006360.
429. Xu Z, Lodge R, Power C, Cohen EA, Hobman TC. The HIV-1 Accessory Protein Vpu Downregulates Peroxisome Biogenesis. *mBio*. 3 mars 2020;11(2):e03395-19.

430. You J, Hou S, Malik-Soni N, Xu Z, Kumar A, Rachubinski RA, et al. Flavivirus Infection Impairs Peroxisome Biogenesis and Early Antiviral Signaling. *J Virol.* 30 sept 2015;89(24):12349-61.
431. Wong CP, Xu Z, Hou S, Limonta D, Kumar A, Power C, et al. Interplay between Zika Virus and Peroxisomes during Infection. *Cells [Internet].* juill 2019 [cité 11 août 2023];8(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678468/>
432. Martín-Acebes MA, Merino-Ramos T, Blázquez AB, Casas J, Escribano-Romero E, Sobrino F, et al. The Composition of West Nile Virus Lipid Envelope Unveils a Role of Sphingolipid Metabolism in Flavivirus Biogenesis. *J Virol.* oct 2014;88(20):12041-54.
433. V'kovski P, Gerber M, Kelly J, Pfaender S, Ebert N, Braga Lagache S, et al. Determination of host proteins composing the microenvironment of coronavirus replicase complexes by proximity-labeling. Kirkegaard K, Dikic I, éditeurs. *eLife.* 11 janv 2019;8:e42037.
434. Riva L, Spriet C, Barois N, Popescu CI, Dubuisson J, Rouillé Y. Comparative Analysis of Hepatitis C Virus NS5A Dynamics and Localization in Assembly-Deficient Mutants. *Pathogens.* 4 févr 2021;10(2):172.
435. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* 15 févr 2013;339(6121):819-23.
436. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* sept 1982;42(9):3858-63.
437. Rocha-Perugini V, Lavie M, Delgrange D, Canton J, Pillez A, Potel J, et al. The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol.* 28 mai 2009;9(1):111.
438. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingard P, Descamps V, Duverlie G, et al. Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol.* 15 janv 2010;84(2):773-87.
439. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, et al. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol.* sept 2007;88(Pt 9):2495-503.
440. Sahuc ME, Sahli R, Rivière C, Pène V, Lavie M, Vandeputte A, et al. Dehydrojuncusol, a Natural Phenanthrene Compound Extracted from *Juncus maritimus*, Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol.* 1 mai 2019;93(10):e02009-18.
441. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* nov 2013;8(11):2281-308.
442. Ferlin J, Farhat R, Belouzard S, Cocquerel L, Bertin A, Hober D, et al. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J Gen Virol.* août 2018;99(8):1086-96.
443. Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, Roingard P, Voisset C, Blanchard E, et al. Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System That Efficiently Replicates the Virus. *J Virol.* mars 2006;80(6):2832-41.

444. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* août 1959;37(8):911-7.
445. Bouyssié D, Hesse AM, Mouton-Barbosa E, Rompais M, Macron C, Carapito C, et al. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics.* 15 mai 2020;36(10):3148-55.
446. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* sept 2016;13(9):731-40.
447. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 20 avr 2015;43(7):e47.
448. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289-300.
449. Rohart F, Gautier B, Singh A, Cao KAL. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput Biol.* 3 nov 2017;13(11):e1005752.
450. Hettema EH, Girzalsky W, van den Berg M, Erdmann R, Distel B. *Saccharomyces cerevisiae* Pex3p and Pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J.* 17 janv 2000;19(2):223-33.
451. Nazarko TY, Farré JC, Subramani S. Peroxisome Size Provides Insights into the Function of Autophagy-related Proteins. *Mol Biol Cell.* 1 sept 2009;20(17):3828-39.
452. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology.* oct 2017;153(4):996-1005.e1.

Annexe