

Mécanismes d'assemblage de la protéine de capsid du virus de l'hépatite C (VHC) et importance de sa variabilité dans un modèle de stéatose viron induite *in vitro*.

HOURIOUX C*, PATIENT R, BLANCHARD E, BRAND D,
ARCANGER-DOUDET F, ROINGEARD P^a.

INSERM ERI19 & PFTI RIO Microscopie Electronique, Université François Rabelais, 37032 TOURS

Résumé : Depuis sa découverte en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) a vu sa recherche longtemps entravée par l'absence d'un système de propagation *in vitro* facile à mettre en œuvre. Dans l'optique de mieux comprendre les aspects tardifs du cycle viral, notre équipe a développé un modèle de sur-expression des protéines structurales du virus, permettant d'étudier l'assemblage et le bourgeonnement viral en microscopie électronique à transmission. Ces travaux permettent de préciser le rôle moteur de la protéine de capsid dans la morphogénèse virale. Au delà de ce rôle structural, cette protéine est aussi un acteur important dans la pathogénicité du virus, et notamment la stéatose hépatique observée au cours de l'infection virale. L'impact de la variabilité du virus sur cette accumulation de lipides peut être également étudié avec notre modèle, en quantifiant les gouttelettes lipidiques induites par des mutants, en microscopie électronique à transmission.

1. Introduction :

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un petit virus à ARN enveloppé, du genre hepacivirus, appartenant à la famille des Flavivirus. Le génome du virus, d'environ 9600 nucléotides, code pour une unique polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (aa), découpée en 10 protéines matures par des peptidases virales et cellulaires. Parmi ces protéines, 3 protéines structurales sont responsables de la formation des particules infectieuses : une protéine de capsid (C) et deux protéines d'enveloppe (E1 et E2). La capsid emprunte la voie de sécrétion pour sortir de la cellule et acquiert son enveloppe virale par bourgeonnement au travers de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Les autres protéines dites "non structurales" sont impliquées dans la réplication virale. Avec un nombre de porteurs chroniques du virus estimé à 170 millions d'individus dans le monde, l'infection par le VHC représente un problème de santé publique préoccupant. Si dans les pays développés le contrôle des voies de transmission ont permis de fortement diminuer l'incidence de nouveaux cas d'infection, la prise en charge des patients atteints d'hépatite chronique représente un challenge important pour les années à venir. Sans traitement, ces infections évoluent après plusieurs décennies vers une cirrhose, qui elle même évoluent en carcinome hépatocellulaire. Par ailleurs, les combinaisons antivirales actuellement disponibles ne permettent de guérir qu'environ 50 % des cas.

2. Travaux réalisés :

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes impliqués dans l'assemblage et la morphogénèse virale du VHC. Nos travaux ont montré que l'expression de cette protéine, en l'absence des protéines d'enveloppe, était suffisante pour permettre le bourgeonnement de pseudo-particules virales (VLPs), observées au niveau des membranes du RE [1, 2]. Nous avons également confirmé l'association de la protéine de capsid avec les gouttelettes lipidiques cellulaires par microscopie confocale (Figure 1C) et immuno-microscopie électronique. Cette interaction, liée à la présence de régions hydrophobes dans la séquence de la capsid, pourrait être une étape essentielle à la morphogénèse de la particule virale, le bourgeonnement viral se faisant souvent au niveau du RE entourant les gouttelettes lipidiques (Figure 1B, flèches). La protéine de capsid du VHC comprend trois domaines : le domaine I, relativement basique et correspondant aux 120 premiers aa N-terminaux, le domaine II, couvrant une région hydrophobe entre les aa 120 et 175, et finalement un domaine III correspondant à la séquence signal (aa 175 à 191) en position C-terminale. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage de la protéine de capsid, mais aussi d'évaluer ses rôles potentiels dans la pathogénèse virale, différents mutants ont été exprimés en cellules BHK-21 (rein de Hamster) ou FLC4 (hépatocytes humains), en utilisant un système d'expression dérivé du virus de la forêt Semliki. La capacité à induire la formation et l'accumulation de gouttelettes lipidiques cellulaires a aussi été quantifiée par microscopie électronique à transmission. Ces mutants ont été élaborés sur la base de comparaisons de séquences protéiques intra ou inter-génotypes, ou sur la base d'un alignement avec la protéine de capsid du GBV-B, virus le plus proche phylogénétiquement du VHC [3]. L'expression de protéines contenant une ou deux délétions dans la partie N-terminale du domaine I (aa 15 à 28 ; aa 60 à 66) n'avait aucune incidence visible sur la capacité de formation des VLPs, ou sur la capacité d'association de la protéine aux gouttelettes lipidiques. Par contre, l'expression d'une protéine comportant une délétion de 18 aa dans la partie C-terminale du domaine I présentait des résultats différents. Bien que ce mutant soit correctement adressé vers le RE, aucun assemblage en VLPs n'a été observé. Ce défaut d'assemblage n'avait aucune incidence sur l'interaction et la localisation de la capsid à la surface des gouttelettes lipidiques. Les raisons pour lesquelles

* Auteur à contacter : hourieux@med.univ-tours.fr - Tel : 02 47 36 60 71

l'amputation de ces 18 aa perturbe l'assemblage viral restent à explorer. La délétion de ce domaine pourrait cependant être à l'origine d'une déstabilisation de la protéine ou intervenir dans une perte de multimérisation de la protéine de capsid pendant l'assemblage de la particule virale. Dans cette hypothèse, il est intéressant de noter que ce domaine est absent de la protéine de capsid du GBV-B, qui ne semble pas constituer le moteur du bourgeonnement de ce virus, à la différence du VHC [3]. Ceci pourrait illustrer des modes de bourgeonnement différents au sein de la famille des *flaviviridae*. L'expression de mutants comportant des modifications dans le domaine II de la protéine a aussi été évaluée. Ces protéines localisées dans le cytoplasme présentaient une perte d'association aux membranes du RE, associée à un défaut de morphogénèse des VLPs et d'association aux gouttelettes lipidiques.

Ces résultats concernant le domaine II de la protéine de capsid du VHC nous ont conduit à nous interroger sur l'importance et le rôle potentiel de ce domaine dans la formation et l'accumulation des gouttelettes lipidiques. Il est fréquemment retrouvé une stéatose dans l'infection chronique par le VHC, cette accumulation de lipides se révélant plus sévère pour les patients infectés par un virus de génotype 3. Dans l'optique de tester cette hypothèse, notre construction de protéine de capsid de génotype 1a a été mutée en substituant la Tyr en position 164 par un résidu Phe retrouvé uniquement dans des séquences de génotype 3. De façon tout à fait intéressante, une accumulation de lipides significativement plus importante a été retrouvée dans les cellules exprimant cette construction, en comparaison des cellules exprimant la forme sauvage (Figure 1A). Ces premiers résultats pourraient expliquer les mécanismes de stéatose plus sévères observés chez les patient infectés par un virus de génotype 3 [4].

L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre les différents rôles de la protéine dans le cycle viral mais aussi dans les aspects probablement multiformes de la pathogénèse liée à l'expression de cette protéine dans les hépatocytes. Les perspectives actuelles de ce travail consistent à évaluer l'impact de ces mutants dans un système de culture complet du virus, récemment mis au point par une équipe japonaise.

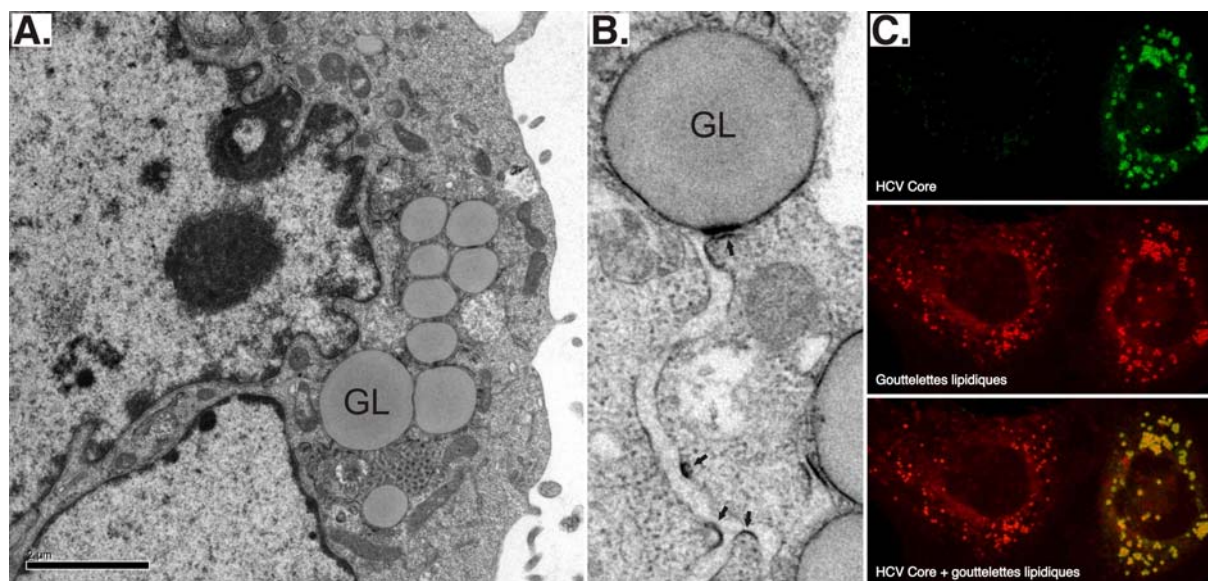


Fig 1 : Expression et Localisation subcellulaire de la protéine de capsid du VHC en MET (A) (B) et microscopie confocale (C). GL : gouttelettes lipidiques.

3. Références :

- [1] Blanchard, E., D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau, and P. Roingeard. *Hepatitis C virus-like particle morphogenesis*. J Virol **76** (2002) 4073-4079
- [2] Blanchard, E., C. Hourieux, D. Brand, M. Ait-Goughoulte, A. Moreau, S. Trassard, P. Y. Sizaret, F. Dubois, and P. Roingeard. *Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111*. J Virol **77** (2003) 10131-10138
- [3] Hourieux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, Fouquenot D, Arcanger F, Brand D, Martin A, Roingeard P. *Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and morphogenesis at the endoplasmic reticulum membrane*. Cell Microbiol **9** (2007) 1014-1027 (Epub 2006 Dec 6).
- [4] Hourieux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, Moreau A, Trassard S, Giraudeau B, Roingeard P. *The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model*. Gut (2007) in press (Epub 2006 Jan 9).