



Inserm



Lyon 1

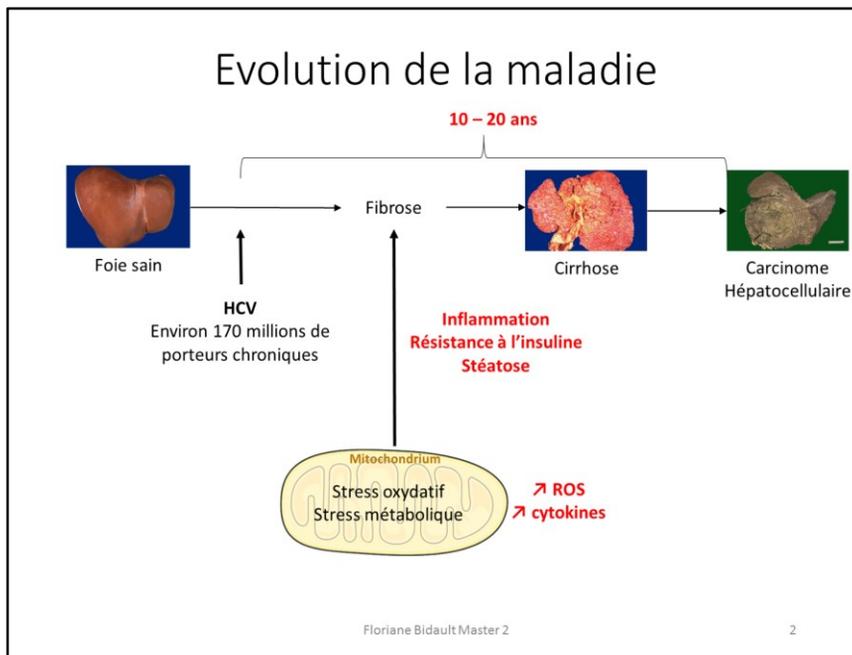
## Impact des altérations mitochondriales viro-induits dans la pathophysiologie de l'hépatite C chronique

**Floriane Bidault**

Master 2 Sciences du Médicament option Développement Analytique et Biopharmaceutique  
à l'ISPB Lyon 1

Stagiaire INSERM U1052 Team Pathogenesis of viral hepatitis

Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard



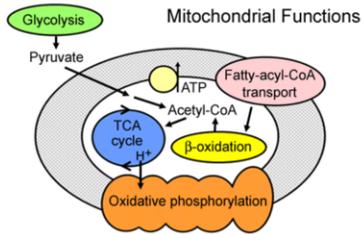
Environ 170 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C dans le monde.

55 à 85 % des personnes infectées développent une hépatite chronique.

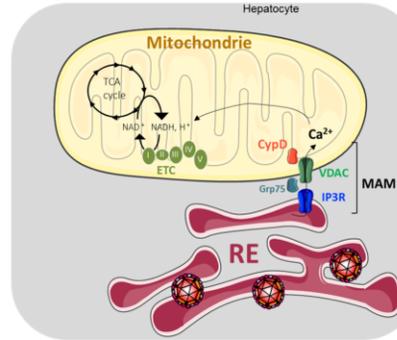
Après plusieurs années, la maladie évolue en fibrose puis en cirrhose (fibrose stade 4, 30 % des cas) et enfin en carcinome hépatocellulaire (2 %).

Cliniquement, l'infection est associée à une inflammation, une résistance à l'insuline et une stéatose liées à une augmentation de la production de ROS et de cytokines. Un organe clé qui joue un rôle dans la production de ROS et des altérations métaboliques sont les mitochondries.

# Les fonctions mitochondriales



↗ production ROS et cytokines : le virus a-t-il un impact sur les fonctions mitochondriales ?  
Etudes fonctionnelles de la respiration et du flux calcique



Structure Mitochondrial Associated Membranes (MAM) entre la réplication virale et les mitochondries :  
le virus a-t-il un impact sur les MAMs ?  
Etude structurale des MAMs

Floriane Bidault Master 2

3

Les principales fonctions physiologiques des mitochondries sont le métabolisme énergétique notamment avec la chaîne respiratoire et la signalisation cellulaire via le calcium.

Les MAMs sont une zone dynamique entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries où de nombreuses protéines sont impliquées dans des voies de signalisation cellulaire telle que le flux calcique. C'est un rapprochement physique/dynamique des structures RE et mito

Plusieurs protéines sont impliquées dans ce flux calcique notamment la protéine du réticulum endoplasmique IP3R, les protéines mitochondriales VDAC et CypD, et la protéine chaperonne Grp75.

La réplication virale est réalisée proche du réticulum endoplasmique.

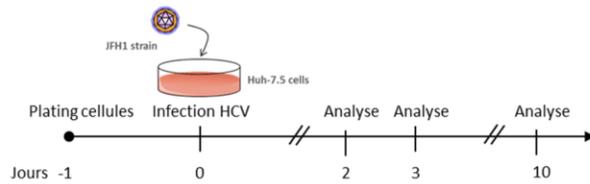
Connaissant l'augmentation de la production de ROS et de cytokines liée aux mitochondries et cette zone liant le réticulum endoplasmique et les mitochondries, on peut se demander si le virus a un impact sur les fonctions mitochondriales et sur les MAMs.

Si il y a un impact, est-ce-que ces changements jouent un rôle dans le stress oxydatif induit par le virus?

Notes : IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate), Grp75 (glucose-regulated protein[protéine

chaperonne]), VDAC (voltage-dependent anion channel) CypD (Cyclophiline D :  
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D)

## Système d'étude utilisé



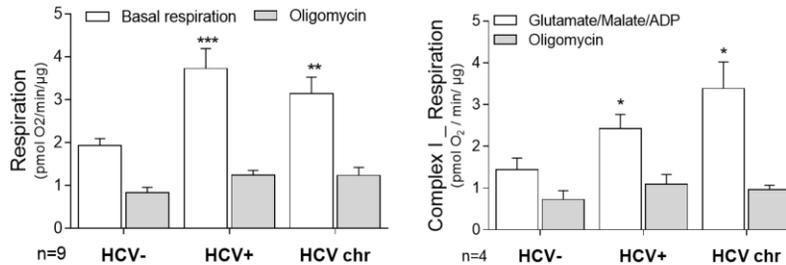
Utilisation de cellules Huh 7.5

Infection avec la souche virale JFH1

Récupération des cellules infectées 2, 3 ou 10 jours post-infection

Pour étudier la possibilité d'un lien entre l'infection virale et le stress oxydatif via les MAMs, nous avons utilisé des cellules Huh 7.5 et la souche virale JFH1.

## Les modifications mitochondriales associées à l'infection : la respiration



Respiration augmenté via l'augmentation de l'activité du complexe I

Quelle(s) protéine(s) virale(s) est/sont responsable(s) de cette augmentation ?

Floriane Bidault Master 2

5

Analyse de la respiration sur cellules globales : on mesure la consommation d'oxygène qui permet d'avoir une représentation de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale comme le complexe I et le complexe II

L'oligomycine bloque l'activité du complexe V. Ceci démontre que la consommation d'oxygène dans les cellules infectées est liée à la production d'ATP.

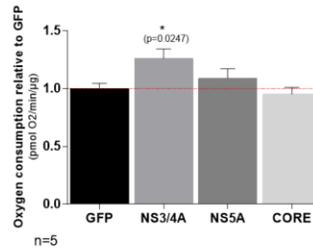
On observe une augmentation de la respiration dans les cellules infectées par HCV via une augmentation de l'activité du complexe I. Cette augmentation de la respiration est liée à une augmentation des ROS (non montré ici).

Quelle(s) protéine(s) virale(s) est/sont responsable(s) de cette augmentation ?

## Influence de la protéine NS3/4A sur la respiration

Utilisation de lignées cellulaires Huh 7.5 exprimant spécifiquement la GFP ou une protéine virale (NS3/4A, NS5A ou CORE) après induction

Différence significative observable de l'augmentation de la respiration pour la lignée exprimant la protéine NS3/4A



**L'effet de la protéine virale est-il dû à une interaction directe avec les mitochondries ?**

Floriane Bidault Master 2

6

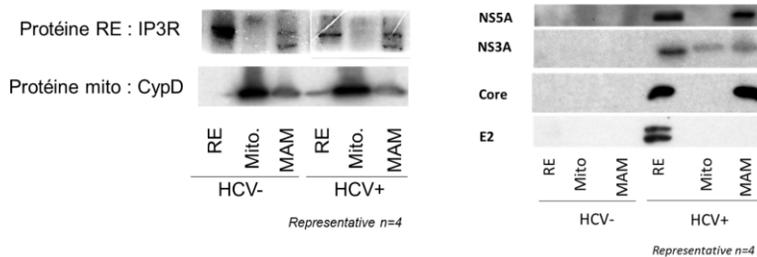
Analyse de la respiration avec des lignées cellulaires Huh 7.5 exprimant spécifiquement la GFP ou une protéine virale (NS3/4A, NS5A ou CORE) après induction.

On observe une différence significative de la consommation d'oxygène pour les cellules exprimant la protéine virale NS3/4A.

L'effet de la protéine virale est-il dû à une interaction directe avec les mitochondries ?

## Présence de protéines virales dans les mitochondries et les MAMs

### WB sur fractionnements biochimiques



**Présence de la protéine virale NS3A dans les mitochondries**

→ cohérence avec les résultats de la respiration

**Présence des protéines virales NS5A, NS3A et Core dans les MAMs**

→ Conséquence ?

Floriane Bidault Master 2

7

Sur le premier WB, on observe que la protéine mitochondriale CypD se retrouve dans les mitochondries et les MAMs, et la protéine IP3R du RE se retrouve dans le RE et les MAMs, la purification est donc propre et les résultats sont exploitables.

La présence de la protéine NS3A dans les mitochondries est cohérente avec les résultats observés avec l'analyse de la respiration.

On observe aussi la présence d'autres protéines virales localisées spécifiquement dans les MAMs (Core et NS5A).

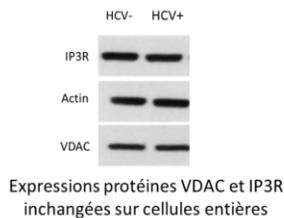
Cette localisation des protéines virales est spécifique. En effet, on ne retrouve pas l'intégralité des protéines dans les mitochondries et les MAMs comme on peut l'observer avec la protéine E2.

Quelle(s) est/sont la/les conséquence(s) de la présence de protéines virales dans les MAMs ?

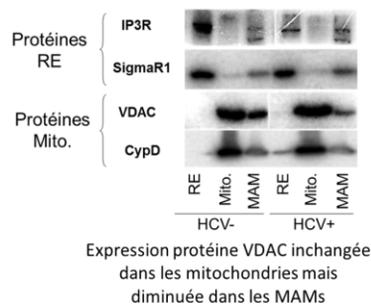
Etude de la structure.

## Comment la structure des MAMs est-elle modifiée ?

### WB sur lysats cellulaires



### WB sur fractionnements biochimiques



**Relocalisation de la protéine VDAC hors des MAMs**  
**Intérêt/besoin du virus ou conséquence de l'infection ?**

Floriane Bidault Master 2

8

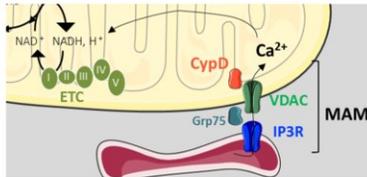
Dans les cellules infectées, on observe une diminution de la présence de la protéine VDAC dans les MAMs.

La quantité totale de la protéine VDAC est inchangée dans les cellules entières et dans les mitochondries ce qui suggère une relocalisation de la protéine hors des MAMs.

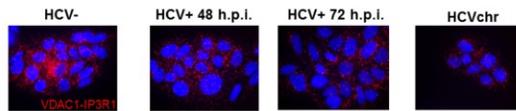
Le rôle physiologique de la protéine VDAC est l'entrée du calcium dans les mitochondries.

Cette relocation est-elle un besoin du virus ou une adaptation de la cellule à l'infection ?

## Les modifications structurales des MAMs influençant leur fonctionnalité



PLA : Proximity Ligation Assay  
VDAC – IP3R



Diminution de la proximité physique entre VDAC et IP3R lors de l'infection

**Influence sur le flux calcique ?**

Floriane Bidault Master 2

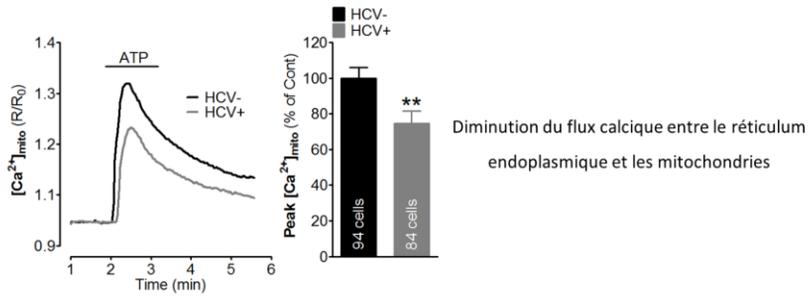
9

La protéine VDAC a besoin de la proximité avec la protéine IP3R pour avoir une quantité importante de calcium dans son environnement proche et permettre le passage du calcium dans la mitochondrie.

Cette diminution de la proximité physique entre les deux protéines induit une diminution de la quantité de calcium auprès de la protéine VDAC.

Cette modification a-t-elle une influence sur le flux calcique entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries ?

## Les modifications du flux calcique



**Diminution du flux mais pas de la quantité de calcium.  
Quelle(s) en est/sont la/les cause(s)?**

Diminution du flux calcique entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries

Floriane Bidault Master 2

10

On observe une même quantité de calcium dans les cellules entières et les mitochondries entre les cellules non infectées et les cellules infectées (non montré ici)

Pour mesurer le flux calcique, on effectue une transfection d'un plasmide exprimant une protéine mitochondriale qui lie le calcium pour avoir un effet senseur.

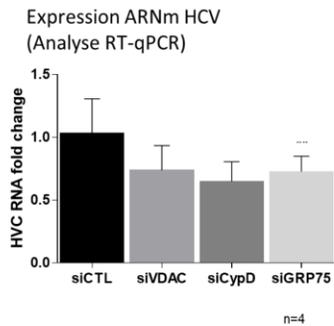
Le boost d'ATP induit la sortie du calcium du réticulum endoplasmique.

On mesure ensuite la capacité d'entrée du calcium dans les mitochondries.

On observe un diminution du flux calcique dans les cellules infectées qui peut s'expliquer par la relocalisation de la protéine VDAC hors des MAMs.

Cette relocation est-elle un besoin du virus ou une adaptation de la cellule à l'infection ?

## Test knockdown de protéines des MAMs



Extinction de l'expression des protéines Grp75, VDAC et CypD

**Observation :** ↓ réplication

Interprétation : le virus modifie les MAMs pour son intérêt

Floriane Bidault Master 2

11

Les MAMs jouent un rôle important dans la réplication du VHC.  
Les knockdowns de la protéine VDAC et des facteurs interagissant avec VDAC au niveau des MAMs ont un effet inhibiteur sur la réplication virale.  
Le virus modifie la structure des MAMs en relocalisant la protéine VDAC pour favoriser sa réplication.

# Conclusions et perspectives

## Conclusion

L'infection virale induit des modifications structurales des MAMs et des modifications fonctionnelles des mitochondries pouvant expliquer le stress oxydatif et les observations cliniques

## Perspectives

Finalisation de la compréhension de l'organisation des MAMs

Caractérisation des effets du virus sur les MAMs

Compréhension des liens entre respiration et infection : interaction directe ou indirecte avec les mitochondries ?

# Remerciements

Au Dr Birke Bartosh, ma responsable de stage

Au Dr Sarah Duponchel, mon encadrante de stage

A l'ensemble de l'équipe l'INSERM U1052 et du CRCL

A l'ensemble de nos collaborateurs sur ce projet