



HAL
open science

Altérations du microenvironnement hépatocytaire suite à l'infection par le virus de l'hépatite C : implication dans la fibrogenèse hépatique précoce

Emma Reungoat

► **To cite this version:**

Emma Reungoat. Altérations du microenvironnement hépatocytaire suite à l'infection par le virus de l'hépatite C : implication dans la fibrogenèse hépatique précoce. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1222 . tel-02028896

HAL Id: tel-02028896

<https://theses.hal.science/tel-02028896>

Submitted on 20 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1222

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Virologie et glycobiologie
Discipline : Infectiologie

Soutenue publiquement le 30/10/2018, par :
Emma REUNGOAT

**Altérations du microenvironnement
hépatocytaire suite à l'infection par le virus de
l'hépatite C : implication dans la fibrogenèse
hépatique précoce**

Devant le jury composé de :

Zoulim, Fabien, PU/PH, Université Lyon 1

Meunier, Jean-Christophe, CR INSERM, Université F.Rabelais (Tours)

Théret, Nathalie, DR INSERM, Université de Rennes 1

Manié, Serge, DR CNRS, CRCL

Papy-Garcia, Dulce, PU, Université Paris Est Créteil

Pécheur, Eve-Isabelle, CR CNRS, CRCL

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Altérations du microenvironnement hépatocytaire suite à l'infection par le virus de l'hépatite C : implication dans la fibrogenèse précoce.

L'hépatite C est une maladie chronique due à l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), qui se transmet par exposition à du sang contaminé. On considère que ce virus infecte 3 à 4 millions de personnes chaque année, sa prévalence pouvant aller jusqu'à 22% de la population générale en Egypte. Ces dernières années, le développement de thérapies antivirales spécifiques basées sur des agents antiviraux directs (AAD) a permis de faire fortement régresser l'infection dans les pays développés. Cependant, les traitements sont extrêmement coûteux, et les mécanismes de l'infection encore mal compris. En effet, le VHC est un virus oncogène, de même que celui de l'hépatite B, les papillomavirus ou encore les virus de type herpès. Contrairement à ces virus, il n'a jamais été démontré que le VHC induise des perturbations génétiques des cellules infectées, et les mécanismes infectieux qui mènent à la transformation cellulaire sont inconnus.

Le VHC infecte les hépatocytes, les cellules épithéliales du foie. L'infection induit de fortes perturbations des métabolismes glucidique et lipidique dans ces cellules, ce qui participe à la pathogenèse virale. Par ailleurs, l'infection se traduit par une accumulation anormale de tissu cicatriciel dans le foie (fibrose hépatique), pouvant sur le long terme conduire à des dérèglements fonctionnels et architecturaux de l'organe (cirrhose) qui deviennent irréversibles. L'ultime étape dans la progression de l'hépatite C est le carcinome hépatocellulaire (CHC) dans 1 à 5% des cas, et une large partie de ces patients meurent dans l'année suivant le diagnostic.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux étapes précoces de la pathogenèse virale, en particulier l'établissement de la fibrose hépatique. Celle-ci résulte de l'accumulation de composés de la matrice extracellulaire (MEC) dans l'espace intercellulaire du foie, alimentée d'une part par la surproduction de ces composés, et d'autre part par la diminution de leur dégradation par leurs enzymes spécifiques. La MEC est un espace complexe composé de facteurs variés qui contrôlent la signalisation intercellulaire. Ce contrôle dépend notamment de l'espace situé immédiatement au-dessus de la membrane plasmique, appelé manteau cellulaire ou glycocalyx. Cet espace est majoritairement composé de protéoglycane comportant un corps protéique sur lequel sont ancrées de nombreuses chaînes de sucres sulfatés, capables de fixer les facteurs de signalisation présents dans la MEC pour les rapprocher ou non de leurs récepteurs. Après avoir démontré dans une première étude (Grigorov et al, 2017) que l'infection par le VHC induisait une diminution de l'expression d'un composant majeur

du glycocalyx dans les cellules infectées, nous nous sommes intéressés plus globalement à l'évolution de cet espace suite à l'infection.

Nos travaux reposent sur des approches pluridisciplinaires regroupant biologie moléculaire, biochimie, et biologie cellulaire. Nous avons ainsi pu étudier en détail les composés du glycocalyx présents à la surface des cellules infectées ou non par le VHC, ainsi que les facteurs de leur voie de biosynthèse. Ces études ont été réalisées sur des modèles d'infection *in vitro*, et également sur des échantillons biologiques de patients à différents stades de progression de l'hépatite C. Nous avons ainsi observé un remaniement important des composés du glycocalyx à la surface des cellules infectées, quantitatif aussi bien que qualitatif, corrélé à des altérations majeures de la voie de biosynthèse de composants de cet espace. Nous avons constaté que la gravité de ces altérations descendait à l'échelle d'un sucre simple, le xylose, élément majeur de biosynthèse de certains protéoglycanes : sa concentration varie entre les conditions contrôle et infectée. Enfin, cette variation de quantité de xylose dans les cellules infectées semble refléter l'altération d'une importante voie de signalisation contrôlant la destinée cellulaire, et dont la régulation repose en partie sur ce sucre.

Ce travail de thèse permet donc d'éclairer une partie de la pathogenèse virale du VHC encore jamais explorée. Ces résultats pourraient participer à l'explication des complications liées à l'infection, puisqu'ils soulignent des problèmes majeurs de communication cellulaire dans les organes infectés. Dans la mesure où les nouvelles thérapies antivirales fonctionnent mal au-delà d'un certain stade de la maladie hépatique, il serait peut-être intéressant de combiner les AAD à des traitements anti-fibrotiques chez ces patients à un stade très avancé.

Abstract

Hepatitis C virus induces alterations in the hepatocyte microenvironment involved in early liver fibrogenesis

Hepatitis C is a chronic liver disease due to the infection by the hepatitis C virus (HCV), through exposure to contaminated blood. An estimated 3 to 4 million people are infected every year, with a viral prevalence rising up to 22% in the general population in Egypt. Over the past years, direct-acting antivirals (DAA) have emerged on the market, allowing a strong regression of the infection in developed countries. However these treatments are very expensive, and the underlying mechanisms of HCV infection remain ill-defined. HCV is an oncovirus, as are among others, the hepatitis B virus, human papilloma viruses, and herpes viruses. Contrary to those viruses, HCV does not seem to alter the genetic background of infected cells. Therefore, infectious mechanisms leading to cellular transformation are still unknown.

HCV infects the epithelial cells of the liver, the hepatocytes. Infection leads to strong disruptions of glucide and lipid metabolism in these cells, contributing to HCV pathogenesis. Moreover HCV infection induces the accumulation of scarring tissue in the intercellular space of the liver, called fibrosis, which can evolve into cirrhosis with irreversible architectural and functional disorders. The ultimate step in hepatitis C progression is the development of an hepatocellular carcinoma (HCC) in 1-5% of cases, and many of these patients die the year following cancer diagnosis.

We aimed at studying the early steps of viral pathogenesis, especially the establishment of liver fibrosis. This is the consequence of extracellular matrix (ECM) deposition in the intercellular space of the liver, fueled by both an oversecretion of ECM components and a lack of ECM degradation by specialized enzymes. The ECM is a complex compartment of the liver which controls molecular cell-to-cell signaling. This greatly depends on what happens in the area situated right above the plasma membrane, called the cell coat or glycocalyx. This area mainly consists of proteoglycans, composed of a core protein on which long chains of sulfated sugars are anchored. These sugar chains are able to recognize and capture a myriad of signaling molecules in the ECM, in order to bring them closer to their receptors. Our first study demonstrated that one major proteoglycan was downregulated following HCV infection (Grigorov et al, 2017). We then decided to study on a more global scale how the glycocalyx evolved following this infection.

Our work here is based on a multi-disciplinary approach combining molecular biology, biochemistry and cellular biology. We studied in details the glycocalyx components present at the

surface of cells infected or not, as well as the expression of factors involved in their biosynthesis. This was first done in *in vitro* cellular models of infection, and extended where possible to biological samples from patients at various stages of chronic hepatitis. We observed a strong quantitative and qualitative reshuffling of the glycocalyx at the surface of infected cells, which correlated with major alterations in the biosynthesis of some proteoglycans. These abnormalities seemed to originate from the amount of a simple sugar, xylose, the main component of the biosynthesis of some proteoglycans. Indeed, intracellular concentrations of xylose were decreased in infected cells. This might bear a link to the observed alterations of a major signaling pathway controlling cell fate, which is partly regulated by xylose.

This study sheds light on a previously unexplored aspect of HCV pathogenesis. Our results could contribute to explain the complications linked to this infection, since they underline major cell-to-cell communication issues. Since most of the DAA-based therapies work badly once liver cirrhosis has settled, it could be interesting to combine antiviral treatments with anti-fibrotic agents in patients suffering from advanced hepatitis C.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	1
Introduction	3
Organisation du foie	3
I. Composition cellulaire du foie	4
A. Les hépatocytes.....	4
B. Les cellules étoilées.....	5
C. Les cellules endothéliales (LSEC).....	6
D. Les cellules immunitaires et l'inflammation dans le foie.....	7
II. Composition matricielle de l'espace de Disse	9
A. Réseau fibrillaire.....	10
B. Les protéoglycanes (PG) et leurs glycosaminoglycanes (GAG).....	11
1. Les glycosaminoglycanes (GAG).....	12
2. Les protéoglycanes libres dans la matrice.....	13
3. Les protéoglycanes de surface dans le glycocalyx.....	14
4. La biosynthèse des héparanes/chondroïtines sulfates PG.....	16
C. Régulation enzymatique des composants matriciels.....	19
1. Les métalloprotéases : MMP, ADAM, ADAMTS.....	19
2. Le shedding.....	22
a. Mécanismes généraux.....	22
b. Contrôle de la voie Notch par le shedding.....	24
c. Le shedding des protéoglycanes (exemple : la famille des syndécans).....	26
3. Régulation de l'activité des métalloprotéases par leurs inhibiteurs spécifiques.....	27
4. Régulation de l'activité des métalloprotéases par d'autres facteurs.....	28
L'hépatite C	30
I. Epidémiologie	30
II. Le virus de l'hépatite C	31
III. Cycle viral du VHC	33
A. Entrée virale.....	33
B. Internalisation du virus et réplication du génome.....	35
C. Assemblage des nouvelles particules virales et sécrétion dans le milieu extracellulaire.....	36

IV. Mise en place de la réponse immunitaire et inflammation spécifique du VHC.....	38
V. Traitements antiviraux.....	39
A. Entre 1989 et 2011.....	39
B. Depuis 2011.....	40
<u>Pathogenèse du virus de l'hépatite C.....</u>	42
I. Pathogenèse virale sur le métabolisme des sucres.....	42
A. Fonctionnement physiologique.....	42
B. Altération du métabolisme glucidique par le VHC.....	43
C. Effet des traitements antiviraux.....	44
II. Fibrose hépatique liée à l'hépatite C.....	45
A. Activation des cellules étoilées dans le cadre de l'hépatite C.....	46
1. Effets directs de l'infection.....	46
2. Effets indirects de l'infection.....	47
B. Altération de la composition matricielle suite à l'infection par le VHC.....	48
1. Stades de fibrose hépatique.....	48
2. Composants matriciels et MMP dans la fibrose hépatique.....	49
Problématiques et intérêt de la thèse.....	51
<i>Matériels & Méthodes.....</i>	52
<i>Résultats.....</i>	58
Partie 1 : L'infection par le VHC induit une sous-expression du SDC1 <i>in vitro</i>.....	58
Partie 2 : Contributions non publiées	59
Altération des composants de surface du glycocalyx suite à l'infection <i>in vitro</i>.....	59
Augmentation du shedding du SDC1.....	59
Modification des chaînes HS/CS.....	60
Altération de la biosynthèse des HSPG dans les cellules infectées par le VHC.....	62
Altération de l'expression des enzymes de biosynthèse.....	62
Etude de l'activité de la XYLT2 après infection <i>in vitro</i>	67
Dosage des sucres composants les chaînes GAG après infection.....	68
<i>Dosage du GlcA, GlcNAc et galactose par UHPLC/MS in vitro.....</i>	<i>69</i>
<i>Dosage colorimétrique du xylose.....</i>	<i>69</i>
La voie Notch est affectée par l'infection par le VHC.....	72

Discussion	74
Altération de l'expression de surface des glycanes.....	74
Altérations dans la voie de biosynthèse des HSPG.....	75
Schéma récapitulatif des principaux résultats.....	79
Intérêt de l'étude dans le contexte actuel et ouvertures	80
Vaccination anti-hépatite C.....	80
Transformation cellulaire et oncogenèse virale précoce.....	81
Conclusions	83

Annexes

Liste des publications

Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx. Grigorov et al. *Cellular Microbiology*, 2017

Molecular cross-talk between the hepatitis C virus and the connective tissue in liver fibrogenesis. Reungoat et al. *Biochemical Journal*, review 2018

TGF- β 1 independent xylosyltransferase-induction after an UDP induced repression of the extracellular matrix in normal human dermal fibroblasts. Fischer et al. *Experimental Cell Research*, 2018

Innovative standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM. Provost et al. *Nature Methods*, 2018

Références bibliographiques

Remerciement

Liste des abréviations

α -SMA : α -smooth muscle actin	HSPG : héparane sulfate protéoglycane
AAD : antiviraux à action directe	HSV : virus herpès simplex
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase	IdoA : acide idorunique
ADAMTS : ADAM with thrombospondin motifs	IL-1 β : interleukine 1 β
CHC : carcinome hépatocellulaire	IRES : internal ribosome entry site
CLDN1 : claudine-1	JFH-1 : japanese fulminant hepatitis 1
CMV : cytomégalovirus	KS : kératane sulfate
CS : chondroïtine sulfate	LDL : low density lipoprotein
CSPG : chondroïtine sulfate protéoglycane	LSEC : liver sinusoid endothelial cell
CTGF : connective tissue growth factor	LVP : lipo-viro particule
DENV : virus de la Dengue	MEC : matrice extracellulaire
DS : dermatane sulfate	MMP : matrix metalloproteinase
EGF : epidermal growth factor	MT-MMP : membrane-bound MMP
FGF : fibroblast growth factor	MS : spectrométrie de masse
GAG : glycosaminoglycane	NECD : NOTCH extracellular domain
GalNAc : N-acétyl-galactosamine	NICD : NOTCH intracellular domain
GlcA : acide glucuronique	OCLN : occludine
GlcN : glucosamine	PDGF : platelet-derived growth factor
GlcNAc : N-acétyl-glucosamine	PG : protéoglycane
GlcNS : glucosamine N-sulfaté	PMA : phorbol-myristate-acetate
GPC : glypican	RE : reticulum endoplasmique
GPCR : récepteur couple aux protéines G	SDC : syndécan
GXYLT : glucoside xylosyltransférase	SLC35D1 : solute carrier family 35 member D1
HA : acide hyaluronique	SVR : réponse virologique soutenue
HGF : hepatocyte growth factor	TGF : transforming growth factor
HPLC : high-performance liquid chromatography	TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
HPV : papillomavirus humain	TNF : tumor necrosis factor
HS : héparane sulfate	UGDH : UDP-glucose deshydrogenase
HSC : hepatic stellate cell (cellule étoilée)	UHPLC : HPLC à haute resolution

UXS1 : UDP-xylose synthase

VEGF : vascular endothelial growth factor

VHB ou HBV : virus de l'hépatite B

VHC ou HCV : virus de l'hépatite C

VIH ou HIV : virus de l'immunodéficience humaine

VLDL : very low density lipoprotein

XYLT : xylosyltransférase

XXYLT : xyloside-xylosyltransférase

ORGANISATION DU FOIE

Le foie est un organe de l'appareil digestif remplissant plus de 300 fonctions vitales, dont le métabolisme des glucides et des lipides, la sécrétion de bile, de protéines circulantes du sang comme l'albumine et de vitamine D, ou encore la détoxification du sang (on parle de clairance hépatique). C'est un organe très fortement vascularisé divisé en deux lobes majeurs (droit et gauche). L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique, dans lequel les cellules hépatiques sont organisées en travées dites de Remak autour des vaisseaux sanguins (sinusoïdes). Le sang circule alors de la veine porte hépatique vers la veine centrale de chaque lobule. La sécrétion de la bile donne également lieu à un autre type de circulation (assurée par les deux types de cellules épithéliales hépatiques) qui part des travées d'hépatocytes vers les canaux biliaires tapissés de cholangiocytes (figure 1).

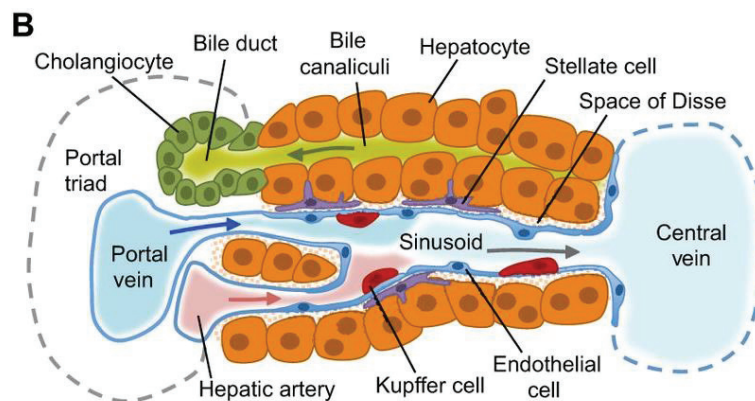


Figure 1 : Organisation cellulaire du foie. Les hépatocytes (en orange) sont organisés en travées autour des sinusoides sanguins, eux même bordés par des cellules endothéliales (en bleu). L'espace de Disse compris entre les travées d'hépatocytes et les cellules endothéliales renferme la majorité de la matrice extracellulaire hépatique, ainsi que les fibroblastes du foie : les cellules étoilées (en violet). Les cellules de Kupffer (en rouge) sont les macrophages résidents du foie. Les hépatocytes bordent d'autre part les canalicules biliaires, dont le contenu s'écoule dans les canaux biliaires bordés par les cholangiocytes (en vert). La circulation sanguine se fait de la veine porte vers les veines centrales (flèches). D'après Gordillo et al. 2015¹.

I. Composition cellulaire du foie

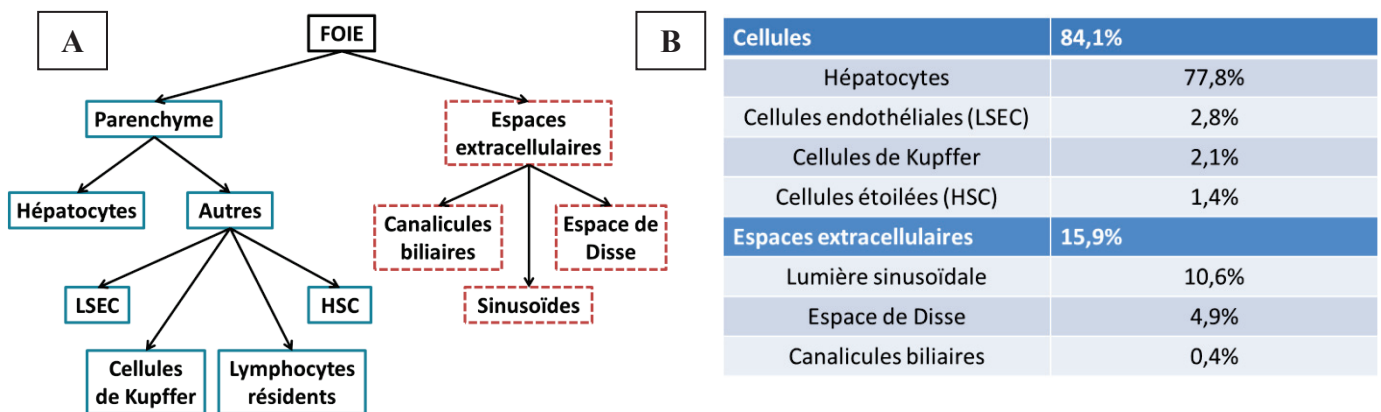


Figure 2 : Composition cellulaire du foie. (A) Compartiments cellulaire et extracellulaire. (B) Pourcentages du volume total du foie en compartiments cellulaire et extracellulaire. LSEC, liver sinusoidal endothelial cells ou cellules endothéliales ; HSC, hepatic stellate cells ou cellules étoilées. D'après Bogdanos et al. 2013².

I.A. Les hépatocytes

Environ 70% des cellules composant le foie sont des hépatocytes, cellules épithéliales polyédriques dont la polarisation particulière repose sur leur contact avec d'une part la circulation sanguine et l'espace de Disse et d'autre part un canalicule biliaire circulant entre un ou plusieurs hépatocytes (figures 2 et 3).

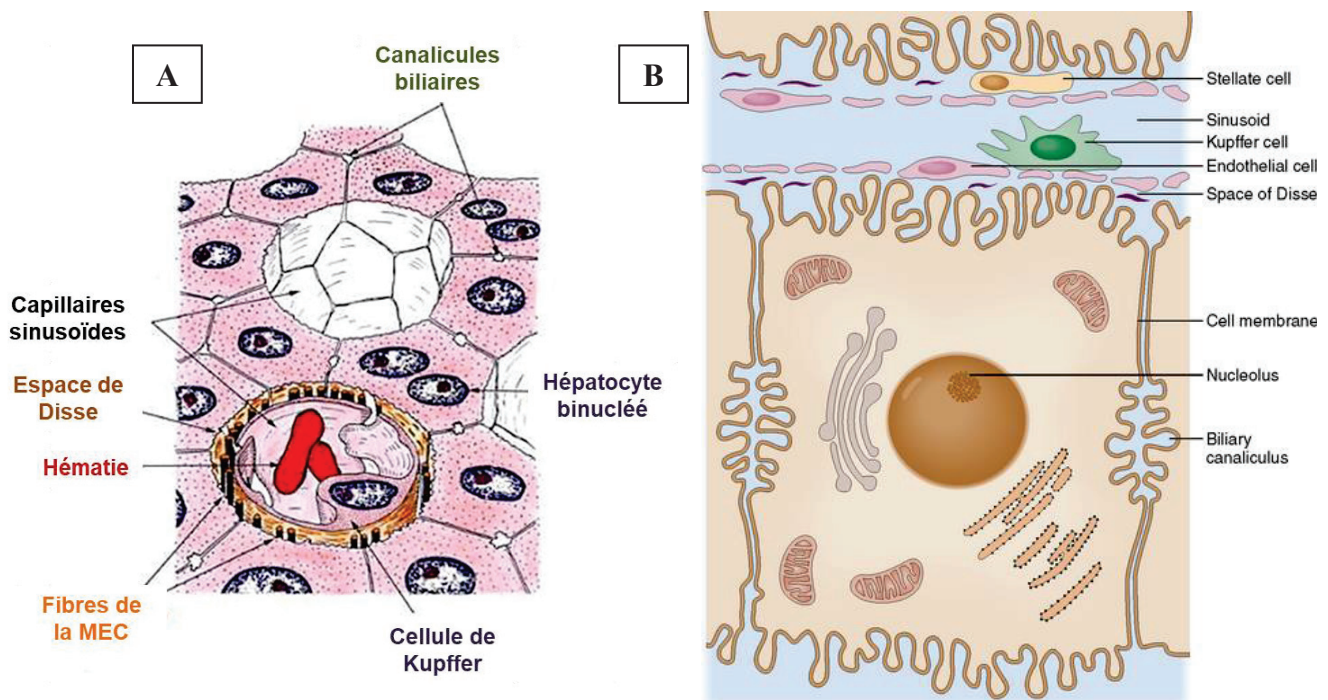


Figure 3 : (A) Organisation des hépatocytes en acini autour des capillaires sanguins sinusoides. (B) La polarisation est partagée entre la membrane côté capillaire (pôle basolatéral) et la membrane formant une partie d'un canalicule biliaire (pôle apical). D'après basicmedicalkey.com

Ces cellules sont organisées en acini dans le foie. Leurs fonctions principales sont la synthèse et la dégradation de glycogène en réponse à l'insuline et au glucagon sécrétés par le pancréas, la néoglucogenèse à partir de lipides ainsi que la synthèse de cholestérol et de phospholipides, la dégradation de l'hémoglobine et la sécrétion exocrine de bile, le traitement de substances toxiques telles que l'alcool ou les drogues et la production des facteurs de coagulation du sang. Ces cellules peuvent être plurinucléées et sont souvent aneuploïdes (elles peuvent porter jusqu'à 8 copies du même chromosome)³. Elles ont une durée de vie moyenne de 5 mois, et ont la particularité de pouvoir se différencier pour se diviser en cas de blessure hépatique, cependant les mécanismes moléculaires qui amènent à ce type de mitose sont encore obscurs, et ne permettent pas de restaurer une architecture normale du foie⁴.

I.B. Les cellules étoilées (HSC)

Les fibroblastes résidents de la matrice extracellulaire hépatiques, appelées cellules étoilées (hepatic stellate cells en anglais, ou HSC) ou cellules de Ito, représentent moins de 10% des cellules totales du foie et sont séparées les unes des autres d'une distance relativement régulière de 40 µm environ (de noyau à noyau)⁵. Cependant leurs extensions cytoplasmiques peuvent couvrir une distance bien plus grande dans l'espace de Disse. A l'état quiescent ces cellules ont pour principal rôle de stocker la vitamine A (rétinoïdes) sous forme de gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme, ce qui leur vaut parfois le nom de lipocytes⁵, et assurent le bon fonctionnement de la matrice extracellulaire (MEC). Ces cellules jouent également un rôle majeur dans le développement et la régénération du foie, en exprimant et sécrétant des facteurs mitogènes de l'hépatocyte, comme le facteur de croissance de l'hépatocyte (HGF) et le facteur de croissance épidermal (EGF)⁶.

Il existe cependant une certaine hétérogénéité au sein de cette population cellulaire en termes de contenu en vitamine A et de capacité à produire les composants de la MEC. Ces cellules quiescentes sont peu prolifératives, peu fibrogéniques et n'ont aucune propriété contractile.

Toute blessure hépatique (alcool, drogue, infection...) entraîne toutefois l'activation des cellules étoilées qui se différencient alors en myofibroblastes : elles s'allongent, perdent progressivement leurs gouttelettes lipidiques et développent des myofilaments dans leur cytoplasme, identifiables par un marquage de l'actine- α du muscle lisse, α -SMA. Ces changements morphologiques s'accompagnent de l'acquisition de nouvelles fonctions cellulaires telles que prolifération, migration, contractilité et une forte synthèse protéique, puisque les HSC activées secrètent abondamment les composants de la MEC. De plus, ces cellules activées produisent des enzymes telles que les métalloprotéases (MMP), capables

de dégrader les composants de la MEC de façon zinc-dépendante. La capacité des HSC activées à détruire la matrice extracellulaire existante pour synthétiser un tissu fibreux est à l'origine du remodelage de la MEC caractéristique de la fibrose. Ces cellules en sont les acteurs de contrôle majeurs. L'activation des cellules étoilées se fait en deux étapes. L'initiation de l'activation est assurée par des composés de signalisation dérivés de cellules immunitaire (cellules de Kupffer), signalant une inflammation de cellules voisines endothéliales ou épithéliales qui souffrent d'un stress (relié à la blessure hépatique), ou encore de changements de composition perçus dans la matrice elle-même. La signalisation qui initie l'activation des HSC est toujours paracrine. Une fois les cellules engagées dans ce procédé, le phénotype est maintenu et amplifié par des signaux autocrine et paracrine véhiculés par des facteurs de croissance et le remodelage de la MEC. Les cellules étoilées activées voient leurs capacités à se diviser, migrer, se contracter et produire des enzymes, facteurs de croissance et récepteurs amplifiées. Elles déposent de plus de plus de composés fibrillaires de la MEC. L'activation des cellules étoilées est toujours observée *in vitro* dès lors que les cellules sont cultivées directement sur du plastique sans substitut de matrice. Ce phénomène doit donc être bien anticipé pour toute étude *in vitro*, pour interpréter correctement les résultats expérimentaux.

I.C. Les cellules endothéliales des sinusoides (LSEC)

L'endothélium des sinusoides hépatiques représente l'interface entre le flux sanguin et les hépatocytes et cellules étoilées, et a la particularité d'être fortement fenestré. L'âge, l'état de santé du foie et de nombreux signaux isolés (tels que des facteurs de croissance) affectent le nombre et la localisation des espaces entre les cellules endothéliales, l'espacement variant entre 50 et 150 μm . Cette barrière perméable est composée de cellules endothéliales appelées LSEC (Liver Sinusoidal Endothelial Cells), dépourvues de membrane basale et présentant une capacité d'endocytose très importante⁷. En condition normale, ces cellules régulent la tonicité vasculaire hépatique et les échanges entre le sang et l'espace de Disse : les pores entre cellules LSEC retiennent les hématies mais laissent passer une multitude de molécules telles que des métabolites, des protéines plasmatiques, des lipoprotéines et chylomicrons, des composés pharmacologiques, des virus (de taille inférieure à 200 nm), et des exosomes, qui peuvent alors migrer vers les hépatocytes ou les cellules étoilées pour y créer de la signalisation. Le transfert de molécules peut aussi se faire de façon contrôlée par les LSEC, via une variation particulière de l'endocytose appelée transcytose⁸. La grande capacité d'endocytose des LSEC combinée à une forte activité lysosomale est le reflet du rôle que ces cellules jouent dans le nettoyage du sang qui arrive au foie, en particulier des macromolécules solubles et des petites particules⁷.

En cas de maladie chronique du foie, ce sont les LSEC qui sont les premières cellules affectées : elles se différencient (on parle aussi de capillarisation) de façon très précoce, avant l'activation des cellules étoilées ou des macrophages. Le maintien de la différenciation des cellules endothéliales est le garant de la quiescence des cellules étoilées^{9,10}, notamment par la signalisation assurée par le facteur de

croissance vasculo-endothélial (VEGF). En cas de dédifférenciation des LSEC, les cellules étoilées s'activent. L'angiogenèse suit la capillarisation des LSEC, et est étroitement liée à la fibrogenèse (l'angiogenèse active la fibrose qui elle-même stimule l'angiogenèse)^{11,12}. Les cellules endothéliales sécrètent alors des signaux angiocrines pour stimuler la régénération de l'organe. En cas de blessure chronique du foie, cette signalisation peut être perturbée et mener à la persistance de la fibrogenèse plutôt qu'à sa résorption¹³. Dans ces cas de maladies chroniques, les dysfonctions endothéliales surviennent de façon très précoce, avant même la fibrose ou l'inflammation, et tendent à persister même en cas de traitement. Il est donc intéressant de noter que des stratégies pharmacologiques visant à améliorer l'état de l'endothélium hépatique dans des maladies chroniques, telle que l'administration de statines^{14,15}, peuvent influencer positivement sur l'évolution de la fibrose.

I.D. Les cellules immunitaires & l'inflammation du foie

Le foie est un organe majeur de métabolisation dont le fonctionnement impacte tous les systèmes physiologiques du corps humain, et son rôle dans la détoxification du sang l'expose également à une myriade de pathogènes et d'antigènes exogènes dans la circulation sanguine dont il doit se débarrasser. Parallèlement, la métabolisation hépatique donne naissance à des néo-antigènes en masse qui ne doivent pas suractiver les composants immunitaires du foie, ce qui aurait des conséquences dramatiques sur l'organisme. Le système immunitaire hépatique est donc doté d'un mécanisme lui permettant de passer d'un état de tolérance à un état de réponse, et *vice versa*, à n'importe quel moment. C'est d'ailleurs cette capacité du foie qui explique la plus grande tolérance dans les greffes de foie par rapport à celles de rein, de peau ou de pancréas par exemple². Le foie peut donc être considéré comme un organe lymphoïde, au même titre que le thymus ou la rate, avec différents composants cellulaires du système immunitaire inné et adaptatif chargés de « scanner » le sang riche en antigènes.

Le représentant cellulaire majeur du système immunitaire hépatique sont les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie. Elles sont impliquées dans l'induction de la tolérance hépatique, notamment en cas de greffe, ce qui est reflété par leurs interactions massives avec les LSEC et certaines populations de lymphocytes. Ces macrophages sont également responsables de la surveillance immunitaire dans l'organe, et sont chargés de nettoyer le sang et les espaces intercellulaires des microbes, déchets métaboliques ou débris cellulaires (corps nécrotiques ou apoptotiques). Les cellules de Kupffer sont présentatrices d'antigènes pour l'activation de l'immunité adaptative, et orchestrent les premières phases de la réponse immune en cas d'infection. Les cellules dendritiques (DC), moins nombreuses que les cellules de Kupffer, sont également aptes à phagocyter les éventuels pathogènes et à les présenter au système immunitaire adaptatif.

La figure suivante récapitule le mécanisme d'activation de l'immunité innée et de l'inflammation dans le foie.

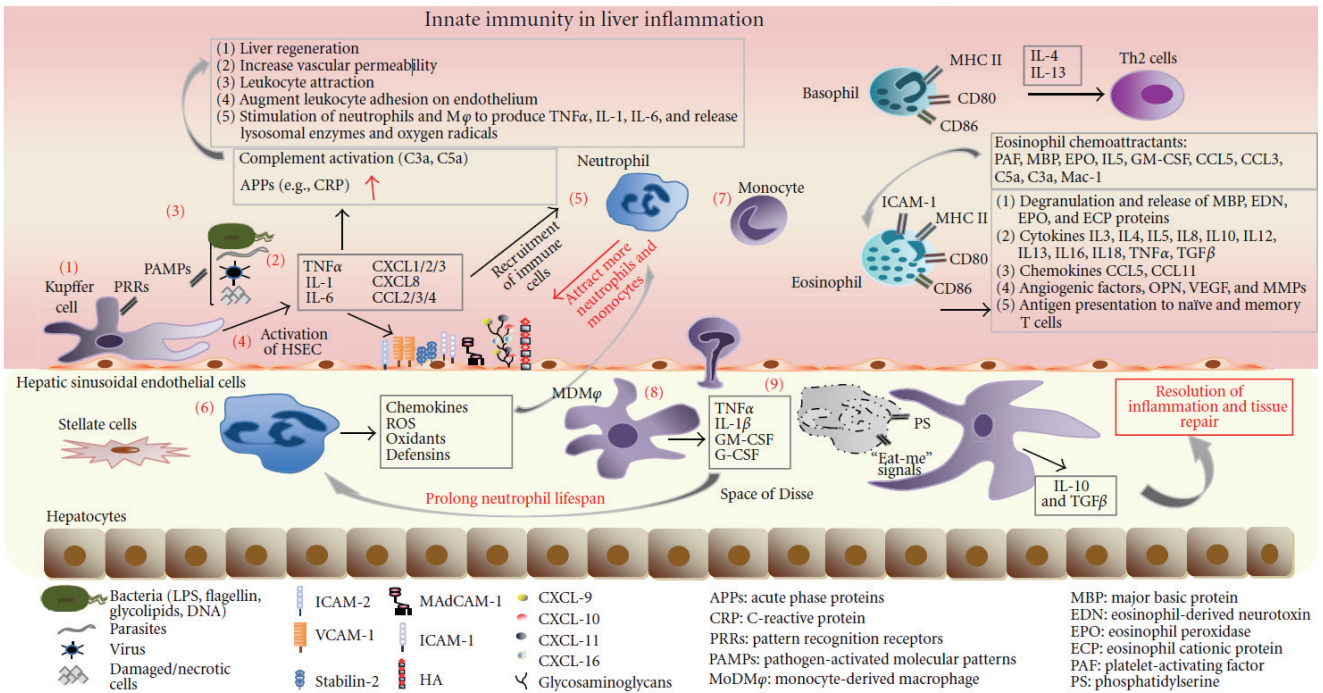


Figure 4 : Immunité innée dans l'inflammation du foie. Lors d'une infection (1) les cellules de Kupffer sont les premières cellules immunitaires à détecter la présence du pathogène via les motifs de reconnaissances d'antigènes PRR/PAMP. (2) L'activation de ces macrophages déclenche la sécrétion de cytokines (TNF α , IL-1 et 6) ainsi que de chimiokines (famille CXCL) qui initie la (3) phase aiguë de l'inflammation, caractérisée par une augmentation de protéines du plasma telles que la protéine C réactive (CRP) et les composants du complément. (4) Les cytokines proinflammatoires activent les cellules endothéliales LSEC (surexpression de molécules d'adhésion de la famille CAM) et aident au recrutement de neutrophiles et de monocytes dans le foie. (5) Les neutrophiles sont les premiers phagocytes qui arrivent sur le lieu de l'infection où ils s'activent (6) et sécrètent de puissantes molécules antimicrobiennes telles que des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des défensines et des chimiokines pour attirer encore plus de phagocytes. (7) Une fois les monocytes recrutés au site de l'infection, ils se différencient (8) en macrophages (MDM Φ) capables de sécréter des facteurs qui allongent la durée de vie des neutrophiles pour maintenir leur présence sur le site de l'inflammation. (9) Pour résoudre l'inflammation, les neutrophiles doivent entrer en apoptose, ce qui représente un fort stimulus antiinflammatoire reconnu entre autre par les phagocytes qui vont éliminer ces cellules mortes. C'est la reconnaissance de motifs phosphatidylsérine (PS) à la surface des neutrophiles en apoptose qui initie leur phagocytose, et qui entraîne la modification du programme transcriptionnel des macrophages, qui sécrètent alors de l'IL-10 et du TGF β (cytokines associées à la résolution de l'inflammation et à la réparation tissulaire). Les basophiles et éosinophiles recrutés dans le foie peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T afin de les activer (Th2), et ainsi activer l'immunité adaptative. D'après Liaskou et al. 2012¹⁶.

II. Composition matricielle de l'espace de Disse

La matrice extracellulaire (MEC) hépatique représente moins de 3% d'une section de foie normale⁵, et est majoritairement représentée par l'espace de Disse situé entre les sinusoides et les travées d'hépatocytes. Cette localisation stratégique entre circulation sanguine et parenchyme hépatique est aussi la raison pour laquelle les altérations qualitatives ou quantitatives de la matrice ont rapidement des conséquences dramatiques pour les fonctions hépatiques. De façon générale, la matrice extracellulaire forme un réseau qui soutient physiquement les cellules d'un organe. La structure, l'élasticité, la tension et la résistance de compression de cet organe dépendent de la MEC. Elle assure l'homéostasie du tissu, *via* ses propriétés biochimiques et biomécaniques dont certaines sont décrites ci-dessous. De plus, l'interaction des composants de la matrice (figure 5) avec la surface des cellules du tissu régule leurs capacités de différenciation, d'adhésion, de prolifération, de migration et de survie. La matrice reconnaît et régule la distribution de facteurs de croissance et de cytokines, contrôlant ainsi la morphogenèse et le métabolisme de l'organe ainsi que les fonctions cellulaires. La MEC représente donc un microenvironnement complexe particulièrement dynamique en constant remodelage, non seulement pendant le développement mais également au cours de diverses pathologies. La régulation de ce remodelage doit donc être un mécanisme bien contrôlé et coordonné pour lutter contre la naissance ou la progression de maladies chroniques¹⁷.

CLASSE	COMPOSANTS	
Protéines	Collagènes	Fibrillaires (I, III, V) Non fibrillaires (IV, VI) FACIT (XIV)
	Elastine	
Glycoprotéines structurales	Fibronectine, laminine, unduline, nidogène (entactine), tenascin, vitronectine, osteonectine, fibrilline, thrombospondine	
Glycosaminoglycans (GAG)	Protéoglycans	Heparane sulfate (HS), chondroïtine sulfate (CS), dermatan sulfate, biglycan, decorine, lumican, aggrecan, perlecan
	Hyaluronane	

Figure 5 : Composants de la matrice extracellulaire hépatique. D'après Gressner et al. 2007¹⁸.

II.A. Composants du réseau fibrillaire

Dans le foie, les composants structuraux principaux de la MEC sont les collagènes de type I, III, IV et V¹⁹. Ils ont pour rôle principal d'assurer la résistance mécanique de la matrice aux tensions et lui confèrent en grande partie sa rigidité. Or, cette rigidité est perçue par les cellules hépatiques qui adaptent leurs comportements en retour : les hépatocytes se différencient sur un support trop rigide, et les cellules étoilées s'activent²⁰.

Un autre composant fibrillaire important dans l'espace de Disse est la fibronectine. Cette glycoprotéine de haut poids moléculaire fait le lien entre des protéines d'adhésion cellulaire, les intégrines, et des composants matriciels comme les collagènes ou les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). La fibronectine joue donc un rôle primordial dans l'adhésion cellulaire, la croissance, la migration et la différenciation, ce qui dénote son importance dans des processus tels que la cicatrisation¹⁷.

D'autres composants tels que les laminines, les ténascines, l'élastine et les fibrillines existent dans l'espace de Disse, et ont pour rôle de connecter et de maintenir la cohésion des réseaux fibrillaires. Les laminines sont des glycoprotéines communément retrouvées dans les lames basales qui interagissent avec les intégrines (elles conditionnent donc la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire ainsi que la survie dans presque tous les tissus). Les ténascines sont de larges glycoprotéines oligomériques peu exprimées physiologiquement, mais importantes pour la cicatrisation. Les fibres élastiques telles que l'élastine et la fibrilline sont des composants essentiels de la MEC qui lui assurent son élasticité. Toutes deux interagissent avec les collagènes et les protéoglycanes¹⁷.

Enfin, les protéines dites matricellulaires sont un groupe de composants de la MEC qui contrôlent les fonctions cellulaires et les interactions/signalisations cellules-matrice. On y retrouve la thrombospondine, l'ostéonectine ou encore des facteurs de croissance du tissu conjonctif, tous capables d'interagir avec des récepteurs cellulaires, des facteurs de signalisation présents dans la matrice (VEGF, TGF β , PDGF...), des protéases ou des composants structuraux de la matrice²¹. La figure suivante permet de mieux appréhender le niveau de complexité d'organisation de la matrice extracellulaire dans l'espace de Disse et l'intrication des composants entre eux.

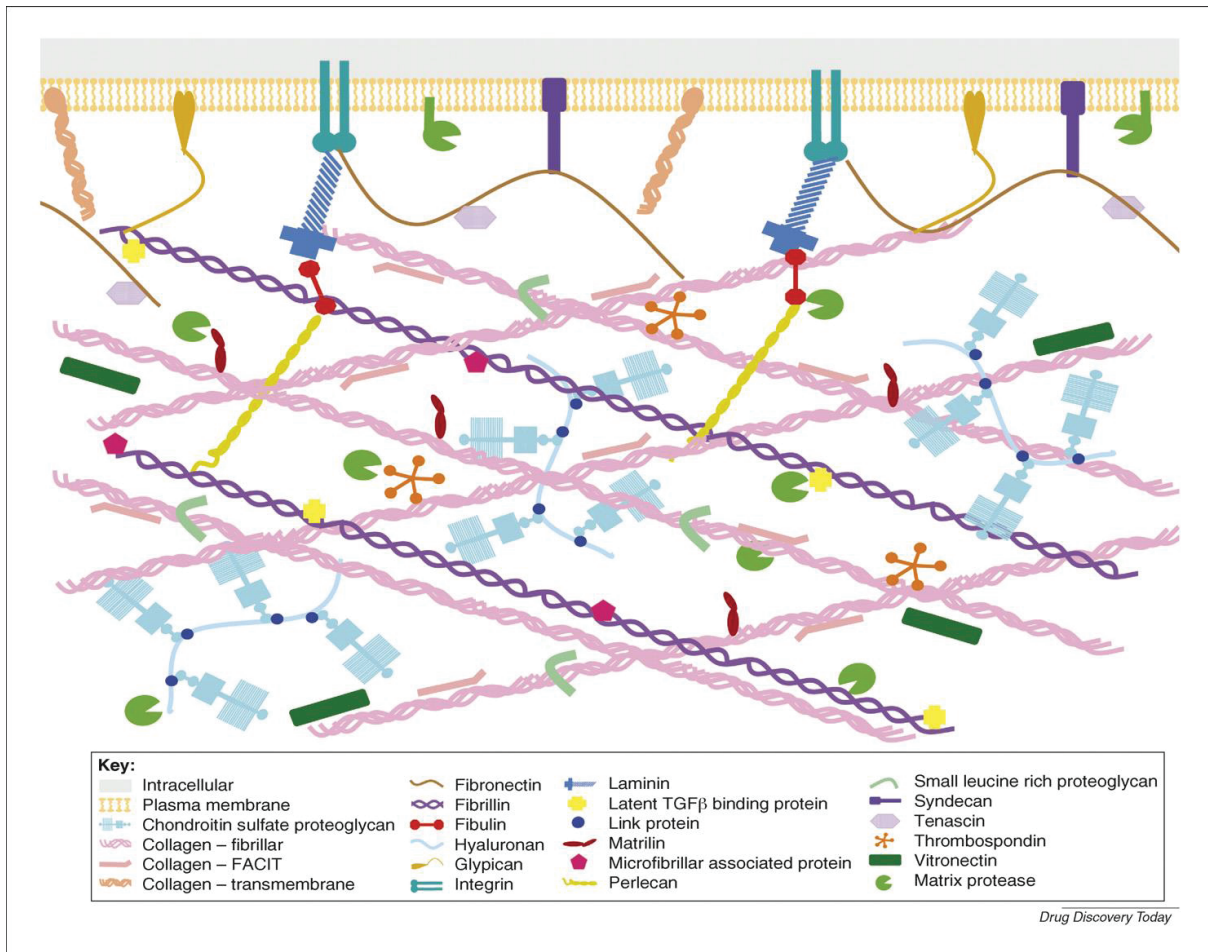


Figure 6 : Représentation schématique générale de l'organisation d'une matrice extracellulaire. Les composés fibrillaires (collagène, fibronectine, etc.) sont connectés entre eux et aux cellules par des glycoprotéines structurales (ténascine, laminine, thrombospondine, etc.). Le niveau d'hydratation de la matrice est maintenu par les protéoglycanes qui peuvent également participer à la construction du réseau fibrillaire. D'après Huxley-Jones et al. 2008²².

II.B. Les protéoglycanes & leurs glycosaminoglycanes (GAG)

Les protéoglycanes (PG) constituent le dernier groupe de composants majeurs de la matrice extracellulaire hépatique. Bien que ce soient des glycoprotéines, portant donc des motifs N- et O-glycans, le type de glycosylation qui définit les protéoglycanes est la présence d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Ces chaînes de sucres contribuent largement aux fonctions biologiques des PG, à un point tel que le corps protéique portant ces chaînes sert parfois uniquement de support aux GAG biologiquement actifs²³. Les PG peuvent être des éléments structuraux de la matrice, ou des ligands pour un grand nombre de petites molécules telles que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, et des morphogènes qui régulent le développement, l'inflammation et la communication cellulaire. Les protéoglycanes sont définis par le type de chaîne(s) GAG qu'ils portent, on parlera par exemple d'héparane sulfate protéoglycane (HSPG) ou de chondroïtine sulfate protéoglycane (CSPG).

II.B.1. Les glycosaminoglycanes (GAG)

Les GAG sont des structures linéaires hétérogènes de sucres sulfatés. Bien que structurellement complexes, ces molécules sont simplement constituées d'une répétition de disaccharides qui alternent un acide uronique et un hexosamine (figure 7).

Acide Uronique	Hexosamine
β -D-acide glucuronique (GlcA)	α ou β -D-glucosamine (GlcN)
α -L-iduronic acid (IdoA)	N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)
	N-acetyl- β -D-galactosamine (GalNAc)

Figure 7 : Unités saccharidiques de composition des GAG.

La nature des disaccharides est caractéristique d'une famille de GAG²³. On en distingue 6 : l'héparine (Hp) et les héparanes sulfates (HS) sont riches en GlcN, les chondroïtines (CS) et dermatanes (DS) sulfates sont riches en GalNAc, les kératanes sulfates (KS) alternent GlcNAc et GlcA et ne contiennent pas d'acide uronique, et enfin l'acide hyaluronique (HA ou hyaluronane) alterne GlcNAc et GlcA. Il est toutefois intéressant de noter que des permutations peuvent avoir lieu, on retrouve alors parfois des glucosamines N-sulfatés (GlcNS) dans des chaînes HS par exemple.

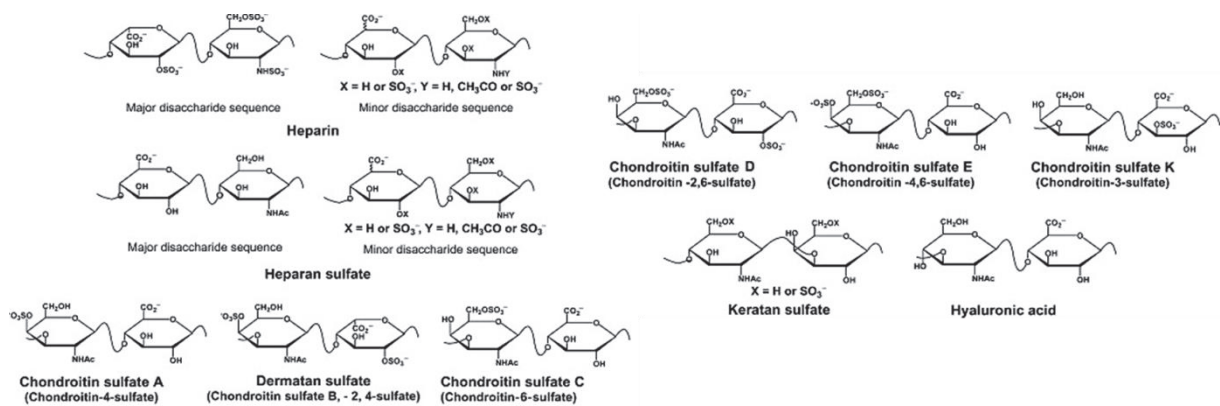


Figure 8 : Les familles de GAG et leurs disaccharides unitaires majeurs. D'après Handbook of glycomics, chapter 3, 2010.

La longueur des chaînes de GAG varie énormément, entre les familles mais également au sein d'un même groupe. Les poids moléculaires sont donc très hétérogènes. Au sein d'une chaîne CS par exemple, on peut compter de 35 à 130 disaccharides²³. De plus, les taux et types de sulfations très variés des GAG associés à leur hétérogénéité de type et de longueur de chaîne contribuent à la diversité des rôles biologiques qu'ils peuvent assumer, et définit même des domaines de fixation préférentiels pour

certaines molécules dans la matrice. Ces dernières années, des efforts spectaculaires ont d'ailleurs été réalisés techniquement pour mettre au point le séquençage de ces sucres²⁴⁻²⁷.

II.B.2. Protéoglycanes libres dans la matrice extracellulaire

La décorine, le biglycan, le perlecan, le versican et l'aggrecan sont des PG que l'on retrouve libres dans la MEC. La décorine est structuralement le plus simple des PG, puisqu'elle ne porte qu'un GAG sur la protéine cœur. Dans le foie, elle est synthétisée par les cellules étoilées et empêche la fixation de certains facteurs de signalisation²⁸. Le biglycan porte deux chaînes GAG et se retrouve aussi bien dans la MEC que dans les liquides biologiques tels que le sérum ou le lait maternel. Il a été proposé comme marqueur de fibrose hépatique chez les patients infectés par l'hépatite B²⁹. Le perlecan (aussi appelé HSPG2) est un PG portant trois chaînes GAG (fréquemment des chaînes HS), que l'on retrouve principalement dans les lames basales et dans l'espace péricellulaire où il permet de stocker certains facteurs de croissance (comme le FGF ou le VEGF)³⁰, et de contrôler leur distribution et leur activité biologique. Il est exprimé dans l'espace de Disse malgré l'absence d'une lame basale clairement définie³¹. L'aggrecan et le versican (respectivement aussi connus sous les noms de CSPG1 et CSPG2) font partie de la même famille de protéoglycanes et portent de très nombreuses chaînes GAG qui leur permettent d'interagir avec de nombreux facteurs de la MEC comme l'acide hyaluronique, et de former des réseaux pour préserver son hydratation et son élasticité³². L'aggrecan est plutôt caractéristique des cartilages, où il participe au maintien de l'élasticité du tissu et joue donc un rôle dans la régénération tissulaire³³, et a peu été étudié dans le foie depuis les années 1990. Enfin le versican compte 4 isoformes selon la quantité de chaînes GAG qui sont attachées, et est principalement exprimé par les cellules étoilées³⁴. La figure suivante permet de visualiser les différences structurales entre certains PG libres de la MEC.

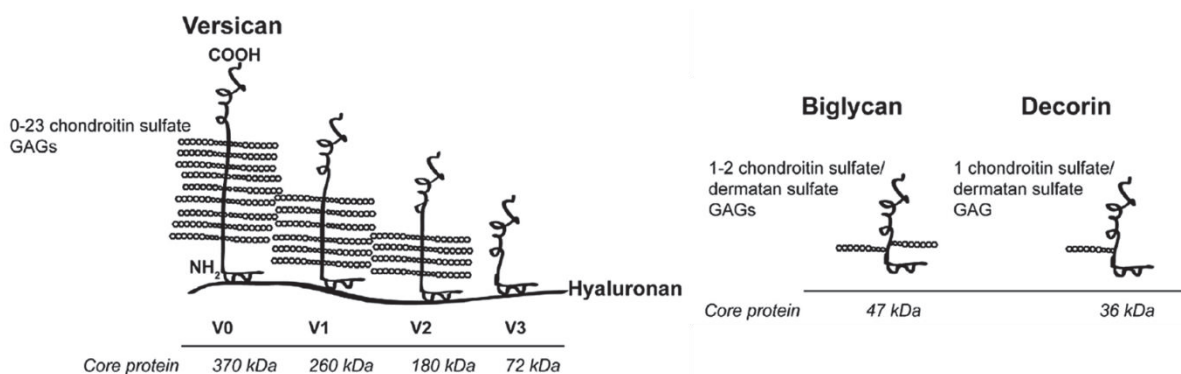


Figure 9 : Structure de trois protéoglycanes libres dans la MEC. Les traits noirs représentent les corps protéiques et les ronds blancs les chaînes de GAG.

II.B.3. Protéoglycanes de la surface cellulaire dans le glycocalyx

Bien qu'ils soient également disséminés dans toute la matrice afin de contrôler son hydratation, les PG sont aussi concentrés au niveau du manteau externe des cellules, au contact de l'espace de Disse

(hépatocytes & cellules étoilées) dans ce qui est appelé le glycocalyx. Cet espace de quelques micromètres au-dessus de la membrane plasmique a beaucoup été étudié dans les endothéliums puisqu'il contribue à la bonne santé vasculaire et peut être un marqueur de certaines maladies cardiaques³⁵. Le glycocalyx est composé de PG, de GAG et de glycoprotéines pour former une barrière perméable qui protège la surface cellulaire et régule les interactions de la cellule avec son environnement.

Une large partie des composants du glycocalyx est constituée de protéoglycanes ancrés dans/attachés à la membrane plasmique, et sont constitués par les glypicans, les syndécans, le TGF β récepteur 3 TGF β 3 (aussi appelé bétaglycan), le CSPG4 (aussi appelé NG2, peu exprimé dans le foie), la thrombomoduline (THBD), l'intégrine α 5 β 1^{36,37}(PG hybride auquel sont attachées des chaînes HS et CS), la neuropiline-1 (NRP1) et CD44³⁸. De façon générale, les composants principaux du glycocalyx sont les glypicans et les syndécans : des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) qui sont rattachés à la membrane plasmique des cellules et qui portent des chaînes de GAG attachés de façon covalente au cœur protéique.

La famille des glypicans (GPC) regroupe 6 protéoglycanes (dénommés GPC1 à GPC6) dont le poids moléculaire de la partie protéique, plutôt que sa séquence, est conservé. Toutefois la localisation des 14 résidus cystéine reste la même, et ces résidus maintiennent la structure globulaire très repliée des glypicans via des ponts disulfures³⁹. Les glypicans peuvent porter jusqu'à 6 chaînes HS attachées au cœur protéique par des sérines. De façon intéressante ces chaînes sont insérées près du domaine C-terminal de la protéine, ce qui les localise près de la membrane plasmique⁴⁰. Les glypicans sont ancrés dans la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), au niveau du pôle apical dans les cellules polarisées, où ils sont associés aux radeaux lipidiques⁴¹.

La famille des syndécans (SDC) comporte 4 membres différenciellement exprimés en fonction des tissus (figure 9). Contrairement aux glypicans, les syndécans sont constitués d'un domaine protéique linéaire constitué d'une courte queue cytoplasmique très conservée impliquée dans de nombreuses interactions (cytosquelette d'actine, jonctions serrées, protéine kinase C et partenaires spécifiques de chaque syndécan)⁴² et signalisations via des résidus pouvant être phosphorylés un domaine transmembranaire qui permet la dimérisation du syndécan et sa résistance à certains détergents, et un long domaine extracellulaire qui porte principalement des chaînes HS attachées à des résidus sérine distants de la surface cellulaire. Les SDC1 et SDC3 peuvent avoir des chaînes CS ou DS substituées aux chaînes HS sur les sérines les plus proches de la membrane plasmique.

Glypicans	Expression tissulaire majeure	Syndécans	Expression tissulaire majeure
GPC1	Ubiquitaire	SDC1	Epithéliums
GPC2	Cerveau, peau, testicules	SDC2	Endothéliums et fibroblastes
GPC3	Placenta, poumons	SDC3	Tissu nerveux, muscles striés
GPC4	Ubiquitaire	SDC4	Ubiquitaire
GPC5	Cerveau, testicules, reins		
GPC6	Vésicule biliaire, foie, vessie		

Figure 10 : Expression tissulaire des glypicans et des syndécans.

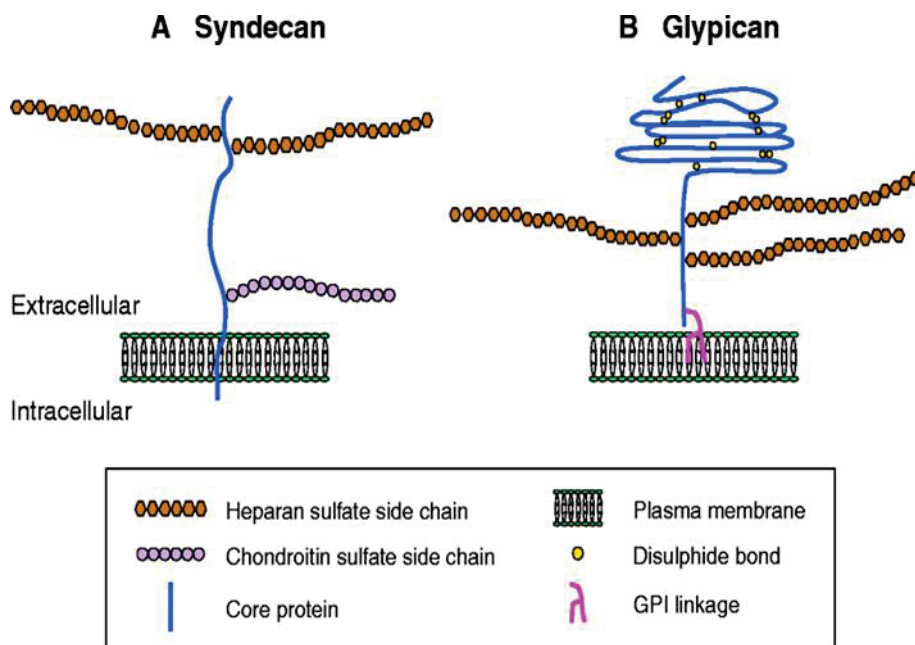


Figure 11 : Représentation schématique d'un syndécan et d'un glypican. (A) Un syndécan est composé d'un corps protéique comportant une région C-terminale cytoplasmique très conservée et ancré dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire. Les chaînes d'héparanes sulfates (HS) sont attachées au corps protéique par des sérines éloignées de la membrane plasmique. Les chaînes chondroïtine sulfates (CS) sont attachées au corps protéique par des sérines proches de la membrane. (B) Un glypican est composé d'un corps protéique globulaire stabilisé par des ponts disulfures et relié à la membrane plasmique par une ancre GPI. Les chaînes HS sont attachées à des sérines plutôt proches de la membrane plasmique. D'après Lin, 2004⁴³.

II.B.4. Biosynthèse des héparane sulfate/chondroïtine sulfate protéoglycane

La synthèse des HSPG/CSPG est initiée dans le réticulum endoplasmique (RE)/appareil de Golgi. Elle fait intervenir une série de glycosyltransférases après la synthèse du corps protéique pour initier et permettre l'élongation des chaînes de sucres sulfatés (figure 12).

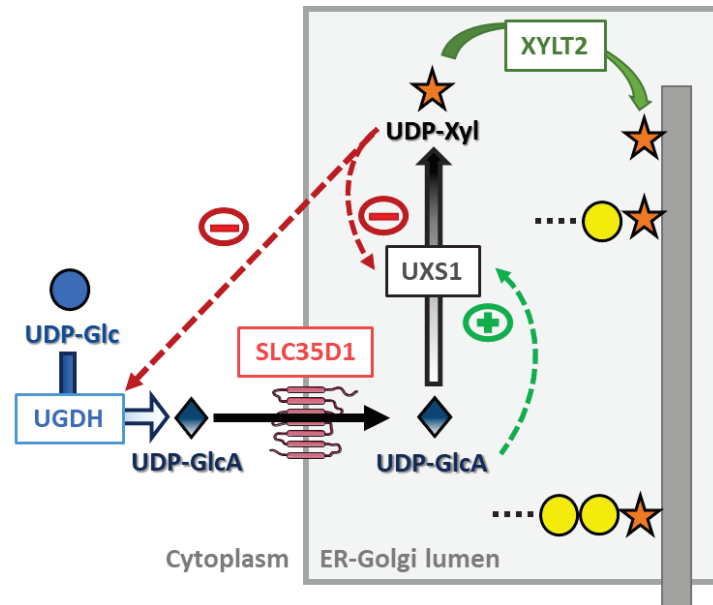


Figure 12 : Initiation de la biosynthèse des HSPG/CSPG. Un glucose (UDP-Glc) est transformé dans le cytoplasme en acide glucuronique (UDP-GlcA) par l'UDP-glucose-6-déshydrogénase (UGDH). L'UDP-GlcA est ensuite transféré dans la lumière du RE/Golgi par le transporteur SLC35D1. Il est transformé dans ce compartiment cellulaire en xylose (UDP-Xyl) par l'UDP-xylose synthase 1 (UXS1), enzyme résidente du RE/Golgi. Dans le foie, le xylose est ensuite pris en charge par la xylosyltransférase-2 (XYLT2) qui le transfère sur une sérine du corps protéique du HSPG/CSPG. La synthèse du reste de la chaîne peut ensuite avoir lieu (ronds jaunes). L'UXS1 est activée par son substrat (UDP-GlcA) et inhibée par son produit (UDP-Xyl), qui est également capable d'inhiber l'UGDH. D'après The Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, 2014.

La fixation du xylose sur le corps protéique ne peut être réalisée que par la XYLT2 dans le foie. Si cette étape n'a pas lieu, alors le corps protéique est envoyé au protéasome. Ce xylose constitue le premier sucre de ce qui est appelé le « tétrasaccharide linker » des chaînes HS : un enchaînement de 4 sucres non substituables qui sont ensuite reconnus par les enzymes d'élongation de la chaîne. Ce motif est toujours constitué d'un xylose (transféré par la XYLT2), suivi de deux galactoses (respectivement attachés par les galactosyltransférases GALT1 et GALT2) et d'un acide glucuronique (transféré par l'acide glucuronique transférase GlcAT1). Une fois le tétrasaccharide synthétisé, la fixation en 5^e position d'un GlcNAc ou d'un GalNAc détermine s'il s'agira d'une chaîne HS ou CS, respectivement. L'élongation de la chaîne peut ensuite avoir lieu, faisant intervenir des enzymes d'élongation différentes

pour les chaînes HS ou CS, et des enzymes de modification des sucres : les sulfotransférases transfèrent un groupement sulfate sur une position hydroxyle ou amine du sucre à partir d'un donneur universel PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate), et les épimérases inversent stéréochimiquement certains carbones et transforment les GlcA en IdoA dans les chaînes HS ou les GlcA des chaînes CS pour les transformer en chaînes DS (figure 12)⁴⁴. Chez les mammifères, on compte 26 enzymes participant à la biosynthèse des chaînes HS⁴⁵. Ces enzymes d'élongation et de modification sont souvent exprimées de façon spécifique dans chaque tissu (la XYLT-1 n'est par exemple pas exprimée dans le foie, au profit de la XYLT-2), ainsi la combinaison et localisation de leurs activités permet de définir des domaines particuliers sur les chaînes HS/CS qui peuvent préférentiellement interagir avec certains facteurs dans la matrice extracellulaire du tissu (c'est le cas par exemple des 3-O-sulfations qui permettent de mieux fixer l'antithrombine sur les chaînes HS⁴⁶). Une étude a été réalisée en 2015 pour déterminer l'affinité de disaccharides CS avec le FGF en fonction de leurs sulfations⁴⁷, et tend à indiquer que le nombre de sulfations influence positivement cette interaction.

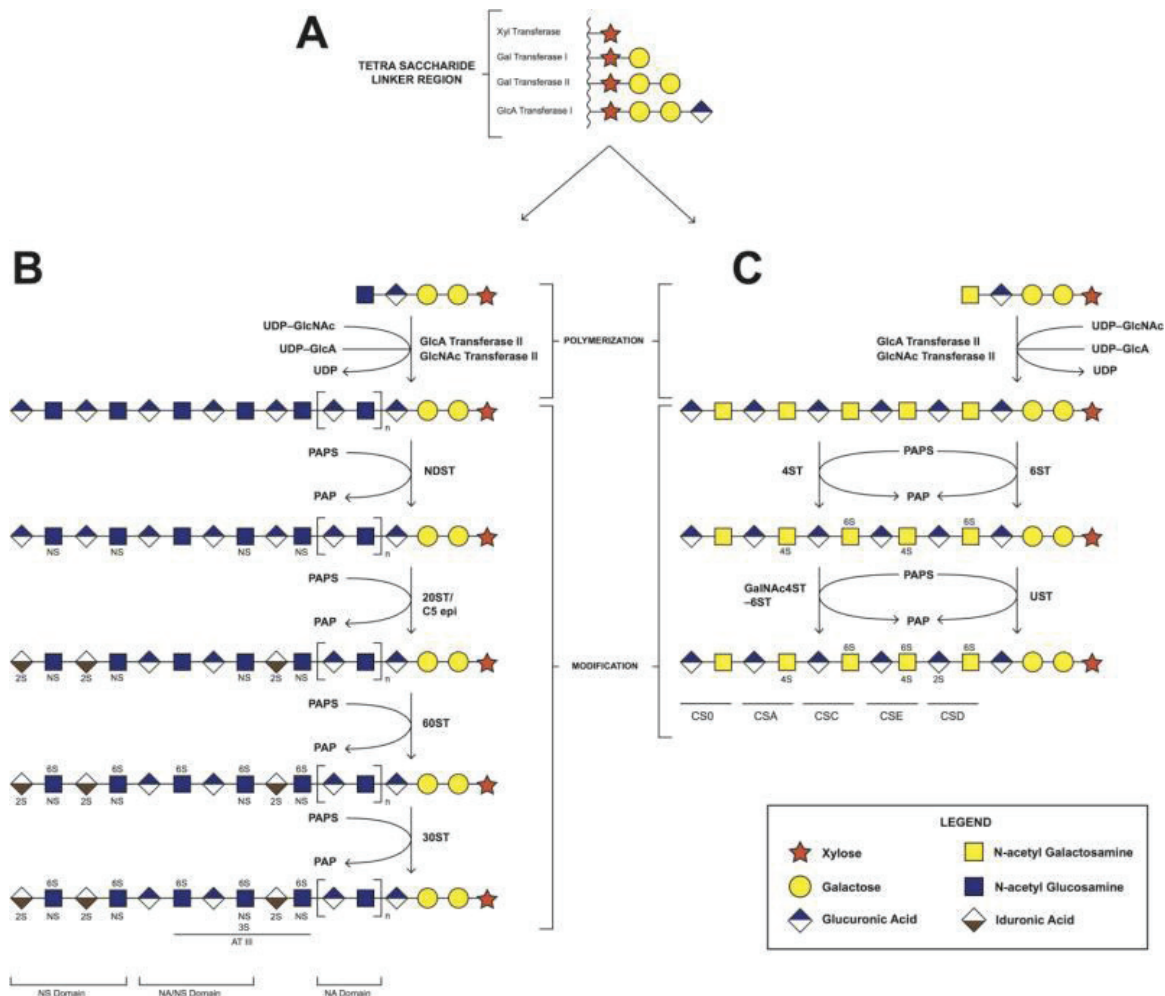


Figure 13 : Biosynthèse des chaînes héparane/chondroïtine sulfate. (A) Synthèse du tétrasaccharide linker. (B) Polymérisation et modifications des chaînes HS (par les sulfotransférases NDST, 2OST,

6OST et 3OST ; et l'épimérase C5). (C) Polymérisation et modifications des chaînes CS (par les sulfotransférases 4ST, 6ST, UST et GalNAc4ST-6ST). D'après Suflita et al. 2015⁴⁴.

Les sucres qui composent ces chaînes HS/CS doivent être activés par ajout d'un nucléotide UDP pour pouvoir être reconnus par les glycotransférases. Les cellules qui synthétisent des GAG contiennent forcément toutes les enzymes nécessaires à la synthèse de ces sucres-nucléotides puisqu'ils ne peuvent pas être importés depuis l'extérieur (il en va de même pour le nucléotide sulfate PAPS qui est utilisé pour la sulfatation des sucres dans les chaînes GAG). Le glucose est le précurseur principal de tous ces sucres (figure 14), bien que le galactose issu de la digestion de lactose puisse être un précurseur pour l'acide glucuronique et le xylose via un intermédiaire glucose⁴⁸. La glucosamine peut aussi être un précurseur *in vitro* si elle est ajoutée au milieu de culture. Ces sucres sont ensuite transférés dans la lumière du RE et/ou de l'appareil de Golgi (l'UDP-Gal par exemple n'est transporté que dans l'appareil de Golgi, au même titre que le PAPS)⁴⁹ par des antiports contre le nucléotide monophosphate issu de la réaction de transfert du sucre sur la chaîne GAG dans le RE/Golgi. Ces transporteurs peuvent prendre en charge un ou plusieurs sucres : par exemple, le transporteur SLC35D1 mentionné précédemment peut prendre en charge l'UDP-GlcA et l'UDP-GalNAc.

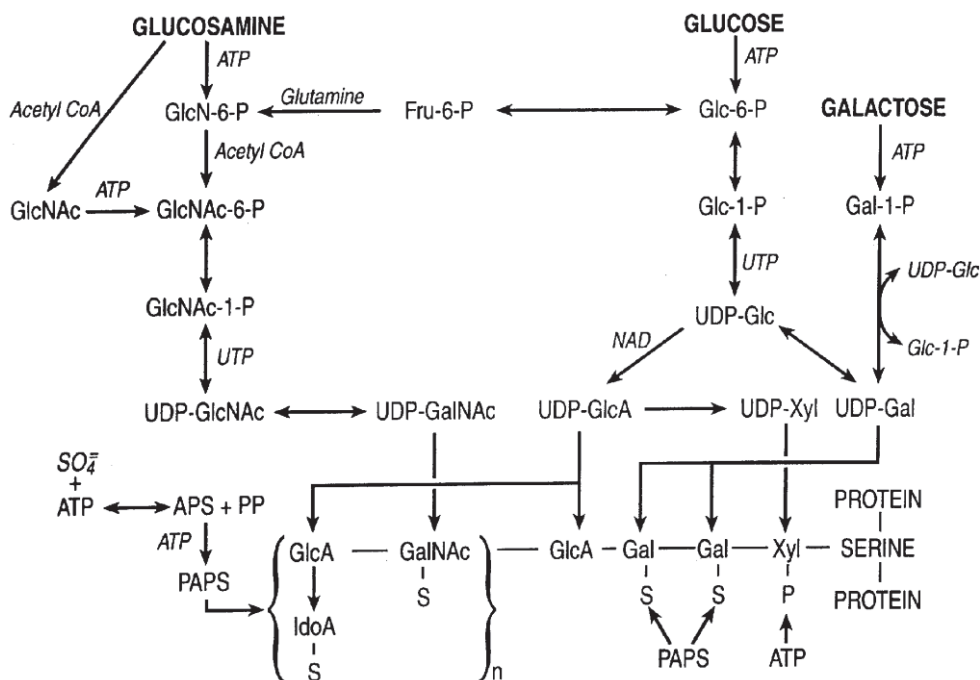


Figure 14 : Origine des sucres précurseurs utilisés pour la biosynthèse des GAG. D'après Silbert et al. 2002⁴⁸.

La grande variété des réactions de biosynthèse et de modification des PG leur confère leur grande complexité en termes de séquence et d'arrangement des chaînes de sucres. Cette complexité est

également reflétée par le corps protéique dont la séquence en acides aminés varie aussi d'une cellule à une autre selon le rôle du PG. Enfin, les PG sont soumis à d'ultimes modifications une fois exportés à la surface des cellules ou dans l'espace intercellulaire. Leurs spécificités sont revues dans le paragraphe suivant.

II.C. Régulation enzymatique des composants matriciels

II.C.1. Les métalloprotéases : MMP, ADAM & ADAMTS

Les collagènes, la fibronectine, la laminine, les protéines matricielles et les protéoglycanes sont les composants majeurs de la MEC hépatique normale. Les cellules en contact avec l'espace de Disse reçoivent des signaux de cet environnement pour maintenir leur homéostasie, et en retour elles envoient des signaux pour entretenir leur environnement, notamment pour que les échanges métaboliques entre sang et hépatocytes soient optimaux, donc que le foie joue correctement son rôle. Cet état physiologique de la MEC repose sur une adéquation entre synthèse de ses constituants par les cellules et dégradation par des enzymes qui y résident. Ces enzymes sont les métalloprotéases de la matrice (MMP), qui jouent un rôle majeur dans toutes les MEC (figure 15).

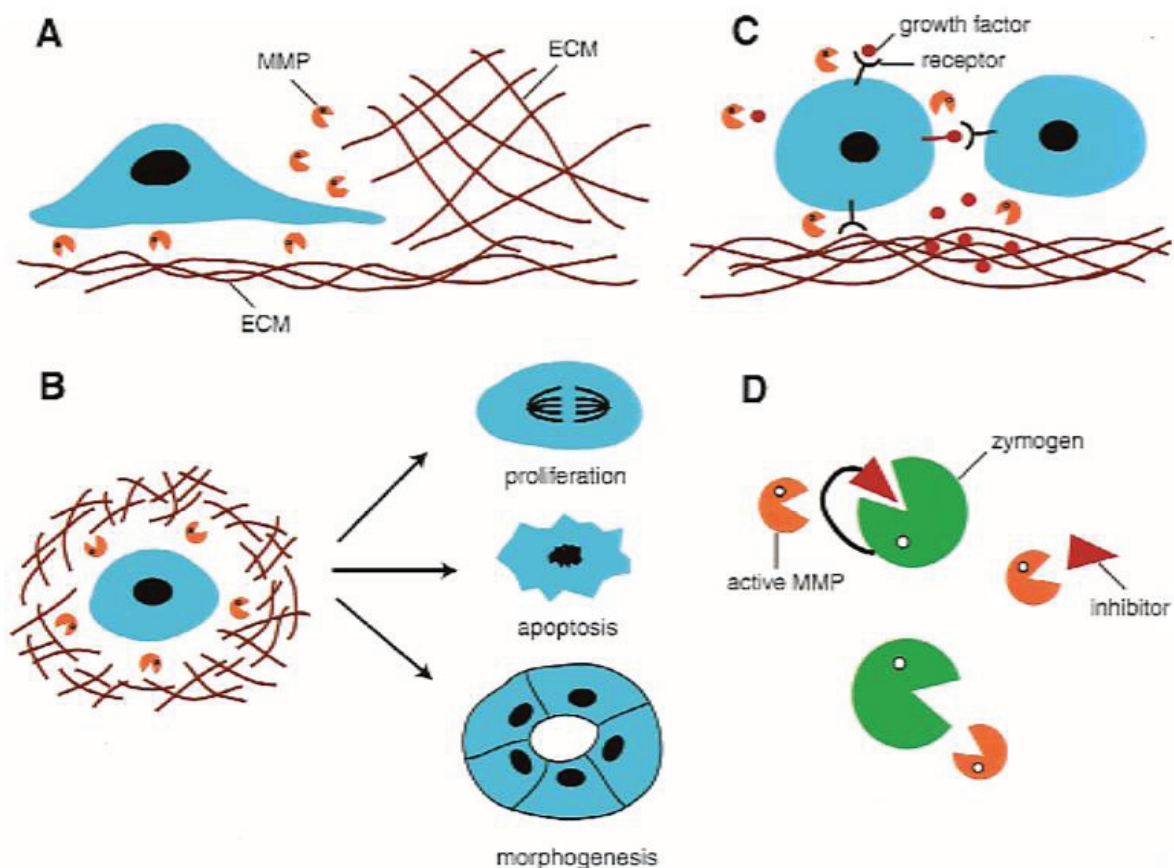


Figure 15 : Modes d'action généraux des métalloprotéases matricielles. (A) Les MMP peuvent affecter la migration cellulaire en changeant le phénotype cellulaire (adhérent à non-adhérent) et en dégradant

la MEC. (B) Les MMP peuvent altérer la composition de la matrice, aboutissant alors à la prolifération, la mort ou la morphogénèse cellulaire. (C) Les MMP peuvent moduler l'activité biologique de molécules actives telles que facteurs de croissance, cytokines ou encore leurs récepteurs en les clivant de la surface cellulaire ou des composants de la matrice pour les libérer. (D) Les MMP peuvent altérer l'équilibre d'une activité protéase en clivant les enzymes ou leurs inhibiteurs. D'après Vu et al, 2000⁵⁰.

La distribution, la quantité et l'organisation des composants de la matrice sont assurées via leur régulation par les MMP. Les nombreux rôles essentiels de ces endopeptidases zinc-dépendantes reposent sur leur capacité à dégrader n'importe quel constituant de la MEC, mais aussi plusieurs récepteurs de surface cellulaire (intégrines), des kinases, des chimiokines ou des cytokines dans la matrice. Ces enzymes sont donc des régulateurs centraux en conditions physiologiques pour des processus comme l'embryogenèse, la cicatrisation ou l'angiogenèse, mais en conditions pathologiques également (fibrose, cancer, infections...)⁵¹.

Elles sont classées en 5 familles selon leur substrat de prédilection : collagénases (collagènes fibrillaires), gélatinases (gélatine et collagène de type IV), membrane-type (MT-MMP), stromélysines et matrilysines (les trois dernières familles ont des substrats très variés tels que collagènes, fibronectine, protéoglycanes, fibrinogène, laminine, etc. et contribuent à la maturation des pro-MMP en MMP)^{52,53}.

Dans le foie, les MMP1, 2, 3, 11 et 13 sont constitutivement exprimées^{54,55} (figure 16). Les MMP1, 2, 3 et 13 dégradent spécifiquement les collagènes de l'espace de Disse, tandis que les MMP3 et 11 ont un spectre d'action plus large sur un vaste ensemble de constituants de la MEC.

Métalloprotéase Matricielle	Catégorie	Substrat
MMP1	Collagénase	Collagènes types I, II, III
MMP2	Gélatinase	Collagène type IV
MMP3	Stromélysine	Collagènes (II, III, IV, IX, X), protéoglycanes, fibronectine, laminine, élastine
MMP11	Stromélysine	Mal connu, collagène de type VI ⁵⁶
MMP13	Collagénase	Collagènes types I, II, III

Figure 16 : Noms et fonctions des principales métalloprotéases hépatiques^{53,56}.

La MMP2 a été particulièrement étudiée dans le foie. Cette métalloprotéase sécrétée par les cellules étoilées est capable de moduler l'activité de l'IL-1 β , du TNF α et du chimioattractant monocytaire MCP3^{50,57} en le clivant pour l'inactiver. Les MMP1 et 3 sont également capables de cliver MCP3.

La grande majorité des MMP ne sont pas sécrétées sous leur forme active dans l'environnement cellulaire. Elles sont d'abord sécrétées sous forme de zymogènes inactifs avec un site catalytique immature qui doit subir un ou plusieurs clivages enzymatiques pour être fonctionnel. Les modes d'activation des MMP sont variés (figure 17)⁵⁸. En règle générale, l'activation d'une MMP se fait via l'activité d'une autre MMP : ces enzymes sont donc en interaction constante dans la MEC, et cette relation représente un niveau supplémentaire de contrôle de leur activité.

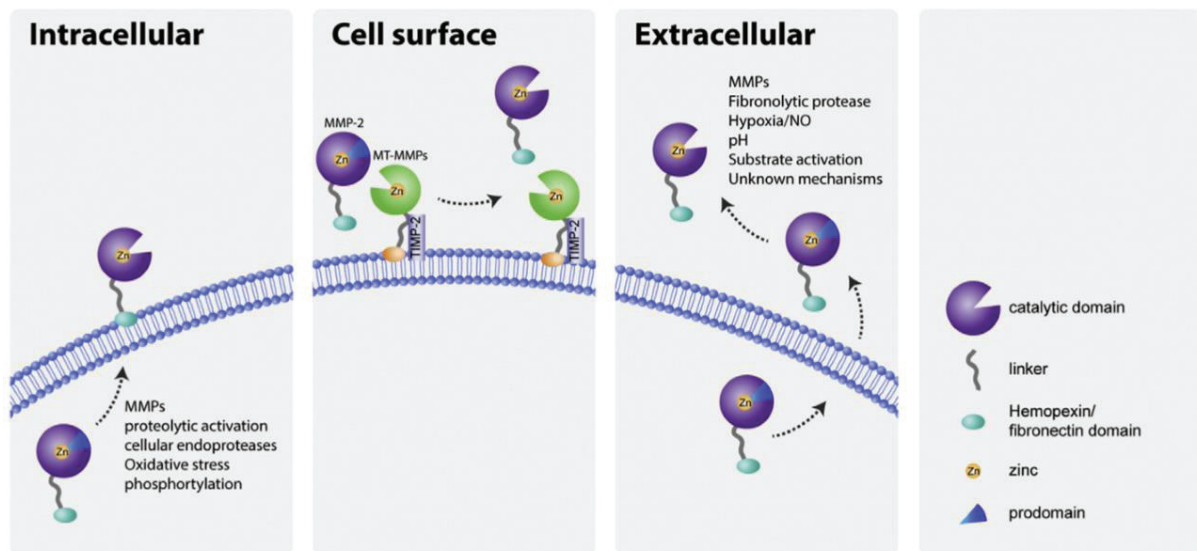


Figure 17 : Représentation schématique des différents modes d'activation des MMP. L'activation intracellulaire ferait intervenir des endoprotéases cellulaires, le stress oxydant ou des enzymes de phosphorylation. L'activation peut aussi se faire à la surface cellulaire (par ex. MMP2) où le clivage qui libère le site actif est réalisé par une autre métalloprotéase attachée à la surface de la cellule (membrane-type MMP). Enfin, l'activation extracellulaire d'une MMP peut être réalisée et régulée par le biais de nombreux facteurs tels qu'indiqués, par ex. d'autres MMP pH-dépendantes. D'après Gaffney et al, 2015⁵⁸.

Il est important de noter que deux autres familles de métalloprotéases d'intérêt existent dans le foie : les ADAM/ADAMTS (« A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain / with Thrombospondin motifs»). Il en existe une quarantaine, ADAMTS et ADAM confondus⁵⁹. Les protéases ADAMTS sont libres dans l'espace matriciel, tandis que les ADAM sont pour la plupart ancrées dans la membrane plasmique à la surface des cellules⁵¹. Les ADAM agissent comme les MMP sur les collagènes, les PG, les intégrines, des récepteurs de surface et génèrent des molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice⁶⁰. Les protéases ADAMTS assurent des fonctions

d'inhibition de l'angiogenèse, de dégradation des PG (notamment l'aggrecan et le versican), de régulation des collagènes et dans la coagulation sanguine entre autres⁵¹.

II.C.2. Le phénomène du shedding

II.C.2.a. Mécanismes généraux

Le domaine extracellulaire de plusieurs protéines ancrées dans la membrane plasmique à la surface des cellules peut être libéré dans l'espace intercellulaire sous forme soluble grâce à un mécanisme protéolytique très régulé appelé shedding. Il concerne aussi bien des facteurs d'adhésion cellulaire ou matriciels que des enzymes, cytokines, facteurs de croissance et leurs récepteurs (figure 18)⁶¹. Ce mécanisme est utilisé par les cellules pour réguler l'expression de surface de certains facteurs et moduler ainsi une grande variété de processus cellulaires et physiologiques. Il permet de convertir rapidement des facteurs associés aux membranes en effecteurs solubles, et de réduire leurs niveaux d'expression en surface cellulaire. Pour certains facteurs, le shedding est un prérequis nécessaire à une protéolyse sur la partie intracellulaire de la protéine afin de libérer un domaine régulateur de transcription (voie Notch par exemple). Le processus de shedding est hautement régulé par des agonistes, antagonistes et voies de signalisation intracellulaires spécifiques.

Facteurs d'adhésion	Facteurs de croissance et récepteurs	Immunomodulateurs et récepteurs	Enzymes	Autres
Collagène XIII	Amphiregulin	Betaglycan	ACE	APP
E-Cadherin	c-Met (HGFR)	CD40	MT1-MMP	Delta
N-Cadherin	EGF	CD93		Jagged
CD44	EGFR	CSF-1		LEPR
ICAM1	Ephrin	CXCL16		Notch
NCAM	Epiregulin	Fas		TfR
PECAM1	FGFR1	FasL		
L-selectin	HB-EGF	CX3CL1 (Fractalkine)		
SDC1	HGF	IL-6R		
SDC4	KL-1	TNF α		
VCAM	TGF α	TNFR1		

Figure 18 : Liste partielle des facteurs libérés dans l'espace intercellulaire par le phénomène de shedding. Les protéines listées sont exprimées dans le foie. D'après Hayashida et al, 2010⁶¹.

Il semblerait que le shedding de certains facteurs soit préférentiellement activé par des molécules de signalisation spécifiques, comme le shedding du TNF α activé par la PKC ϵ ⁶², celui du facteur de croissance HB-EGF activé par la PKC δ ⁶³ ou encore le shedding du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) activé

par les PKC δ et PKC η ⁶⁴. La déplétion des cellules en cholestérol induit un déplacement des substrats du shedding au niveau des radeaux lipidiques, et stimule le clivage de leur ectodomaine^{65,66}. De même, un rapprochement de plusieurs molécules d'un substrat (clustering) induit le shedding^{67,68}. Enfin, une interaction du substrat avec un partenaire d'intérêt peut également favoriser le shedding.

Les esters de phorbol tels que le PMA sont des activateurs du shedding, indiquant que la protéine kinase C (PKC) joue un rôle-clef dans ce processus. De plus, les inhibiteurs des protéines tyrosines kinases (PTK) ainsi que les inhibiteurs des MAP kinases (MAPK) inhibent le shedding, tandis que les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G, des ionophores du calcium ou le sphingolipide céramide induisent le shedding d'un certain nombre de facteurs, ce qui indique que de nombreuses voies de signalisation régulent ce phénomène⁶¹. Il peut enfin être activé globalement par différents stimuli tels que le PMA et le pervanadate (agents pharmacologiques), ou encore des facteurs de croissance, des toxines bactériennes ou des inducteurs de stress cellulaires tels que l'hyperosmolarité (traitement NaCl), le stress membranaire (traitement céramide)⁶⁹ ou le stress oxydant (traitement peroxyde d'hydrogène)⁷⁰.

Le domaine cytoplasmique des cibles du shedding peut également jouer un rôle dans sa régulation, notamment par des interactions avec des facteurs intracellulaires. La calmoduline et le calcium semblent activer le shedding⁷¹⁻⁷³, tout comme la voie des MAP kinases et les récepteurs couplés à des protéines G (GPCR), en particulier le shedding des syndécans 1 et 4⁶⁹, via un mécanisme qui implique des métalloprotéases (voir-ci-dessous).

Les enzymes qui effectuent le clivage des ectodomaines dans le phénomène de shedding, appelées sheddases, sont des métalloprotéases. ADAM17 (anciennement appelée TACE) fait partie des sheddases les plus étudiées, en particulier son rôle dans l'activation de la voie Notch⁷⁴ impliquée dans de nombreux cancers. Elle joue également ce rôle de sheddase pour les récepteurs aux TNF, la L-sélectine⁷⁵, la chimiokine CX3CL1⁷⁶ (anciennement appelée fractalkine), et le HB-EGF^{77,78}. Les MMP sont également fortement impliquées dans le shedding, avec un ou plusieurs substrats par enzyme (figure 19).

Sheddase (MMP)	Cibles
MMP2	SDC2
MMP3	FasL, HB-EGF
MMP7	TNF α , FasL, HB-EGF, E-cadhérine, β 4 intégrine, SDC1
MMP9	E-cadhérine, ICAM1, SDC1, SDC4
MMP14 (MT-MMP)	TNFSF11, CD44, SDC1

Figure 19 : Exemple de métalloprotéases impliquées dans le shedding de divers substrats. D'après Hayashida et al, 2010.

Ainsi, comme pour leurs substrats dans l'espace matriciel, les MMP ont la capacité de cliver les ectodomains de nombreux facteurs membranaires. C'est très probablement l'expression relative des différents partenaires dans un tissu donné à un moment donné, ainsi que l'expression des régulateurs du shedding qui définit précisément et de façon extrêmement contrôlée le ou les substrats-cible. Comme pour leur activité matricielle, la position de la région qui contient le site de clivage (et donc sa distance par rapport à la membrane plasmique) influence davantage l'efficacité du shedding qu'une séquence protéique spécifique. Le clivage ne peut avoir lieu qu'à partir d'une certaine distance de la membrane⁷⁹.

II.C.2.b. Contrôle de la voie Notch par le shedding

C'est le cas de la voie Notch, dans laquelle la liaison d'un récepteur Notch (1 à 4) avec l'un de ses substrats présent à la surface d'une cellule voisine (protéines Delta ou Jagged par exemple) provoque deux clivages successifs du récepteur : l'ectodomaine extracellulaire de Notch (Notch Extracellular Domain, NECD) est clivé en premier par des métalloprotéases telles que ADAM10 et ADAM17, puis le domaine intracellulaire (NICD) est à son tour clivé et libéré dans le cytoplasme par le complexe protéolytique γ -sécrétase (regroupant la protéase préséniline- γ et ses co-facteurs), afin de migrer dans le noyau pour y jouer son rôle d'activateur transcriptionnel de ses gènes cibles (tels que SOX9, HES1 et HES4)⁸⁰⁻⁸²(figure 20).

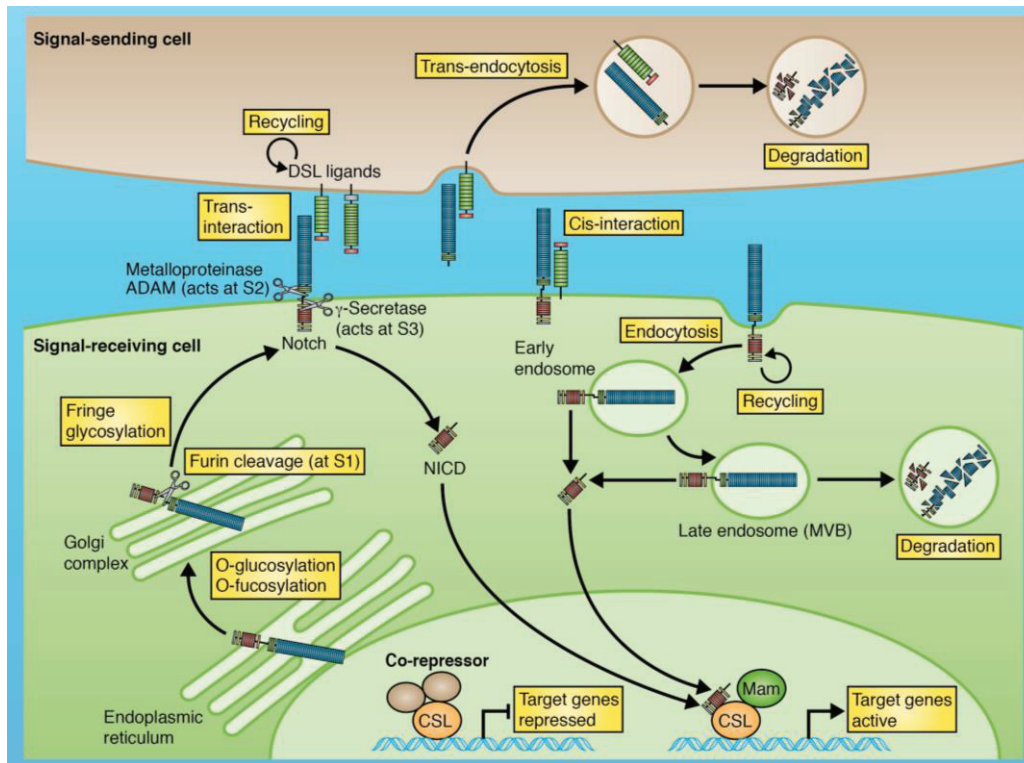


Figure 20 : Représentation schématique globale de la voie Notch. Les récepteurs Notch (1 à 4) comprennent 3 sites de clivages (S1 à S3) : le premier clivage représente une modification post-traductionnelle qui permet la maturation de Notch dans l'appareil de Golgi avant son export à la surface cellulaire. Les sites S2 et S3 sont successivement clivés après reconnaissance par Notch de son substrat à la surface d'une cellule voisine, ce qui mène à la libération du domaine extracellulaire de Notch lié à son substrat (NECD en bleu) et au domaine intracellulaire (NICD en marron). Le NECD est endocyté dans la cellule voisine avec son substrat pour être dégradé, alors que le NICD est transloqué dans le noyau de la cellule cible pour activer la transcription de gènes cibles de la voie. D'après Hori et al, 2013⁸⁰.

Il est intéressant de noter que des glycosylations sur les motifs EGF de l'ectodomaine du récepteur Notch contrôlent son clivage par les métalloprotéases (figure 21). Un glucose, fucose ou N-acétylglucose (GlcNAc) sont directement attachés aux motifs EGF par différentes enzymes comme la glucosyltransférase POGlut1 (Rumi est l'homologue chez la drosophile) responsable de l'attachement du glucose. De courtes chaînes de sucres peuvent alors être élonguées, comme par exemple avec l'ajout de deux xyloses successifs sur le glucose par des xylosyltransférases (GXylT et XXylT)⁸³. Il semblerait que la glucosyltransférase Rumi soit également capable de réaliser ce transfert⁸⁴. Ces modifications post-traductionnelles contrôlent l'activité de la voie Notch puisqu'elles permettent d'une part que le récepteur soit correctement replié à la surface de la cellule, et d'autre part favorisent son interaction avec des ligands présents à la surface de la même cellule (liaisons *cis* inhibitrices de l'activité

de la voie Notch) au détriment de la reconnaissance de ligands sur une cellule voisine (liaisons *trans* activatrices de la voie)⁸⁵. La xylosylation de Notch contribue donc à l'inhibition de la voie.

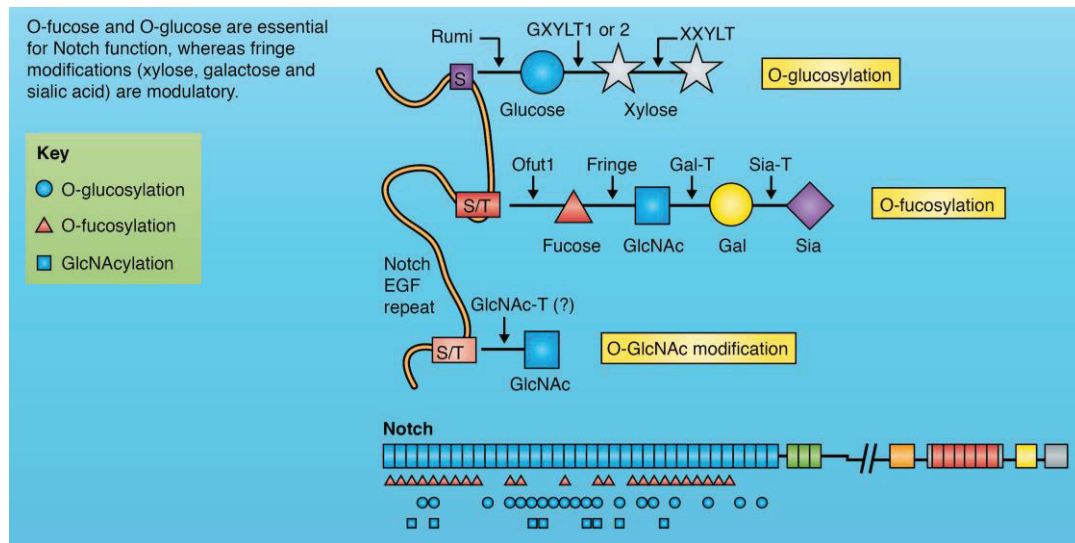


Figure 21 : Glycosylation des motifs EGF des récepteurs Notch. Trois types de glycosylation sont possibles, une glucosylation (suivie de deux xylosylations) par l'enzyme Rumi, une fucosylation (suivie de l'élongation de chaîne GlcNac-Gal-Sia) par l'enzyme Ofut1, et le transfert d'un GlcNac directement sur le motif EGF sans élongation de chaîne par une enzyme encore inconnue. D'après Hori et al, 2013⁸⁰.

L'activation de cette voie contrôle ce qui est décrit comme la « destinée cellulaire » et dépend de l'expression ou non des substrats sur les cellules voisines selon leur état. De nombreux processus tels que la différenciation, la prolifération ou encore la mort cellulaire sont influencés par cette voie. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses études aient révélé des dysfonctionnements de la voie Notch dans de nombreux cancers⁸⁶⁻⁸⁸, y compris le carcinome hépatocellulaire où cette voie est protumorale⁸⁹.

II.C.2.c. Shedding spécifique des protéoglycanes (avec comme exemple la famille des syndécans)

Les PG attachés à la membrane plasmique des cellules fonctionnent principalement comme des co-récepteurs ou des « porteurs » (carriers) de nombreux facteurs capables de s'attacher sur les chaînes GAG (collagènes, chimiokines, cytokines, facteurs de croissance...). La majorité de ces PG peuvent également fonctionner comme effecteurs paracrine ou autocrine solubles dans la matrice via le shedding de leur ectodomaine portant les chaînes de sucres auxquelles sont attachés les facteurs de signalisation³⁸. Ce phénomène permet donc d'une part de changer le phénotype de surface des cellules en réduisant leur capacité à reconnaître certains facteurs portés par les PG, et d'autre part de générer des ectodomains solubles de PG dont les chaînes de sucres sont intactes et peuvent agir de façon paracrine ou autocrine. Les syndécans (en particulier le SDC1, voir figure 22) et CD44 sont clivés par des métalloprotéases, tandis que les glypicans sont clivés au niveau de leurs ancres GPI par des phospholipases. Le mécanisme de shedding des autres PG est encore inconnu.

Activateurs du shedding du SDC1	Sheddases
PMA, sphingomyéline/céramide, EGF, FGF, insuline, TNF α , RANTES, stress cellulaire (hyperosmolarité, choc thermique), ROS, héparanase, toxines bactériennes	MMP7, MMP9, MMP14, ADAM17

Figure 22 : Liste partielle des activateurs et enzymes effectrices du shedding du SDC1. D'après Nam & Park, 2012³⁸.

Une fois l'ectodomaine clivé par la sheddase, le reste de la protéine ancrée dans la membrane peut être également clivé par le complexe préséniline/ γ -sécrétase, comme c'est le cas pour les protéines de la famille Notch.

II.C.3. Régulation de l'activité des métalloprotéases par leurs inhibiteurs spécifiques (TIMP)

Les inhibiteurs de métalloprotéases TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteases) contrôlent la protéolyse matricielle par inhibition directe des MMP/ADAM/ADAMTS. Ces protéines insèrent une ancre dans le site catalytique des protéases et chélatent les ions zinc qui seraient susceptibles d'activer les métalloprotéases⁹⁰. Il en existe 4 qui sont spécifiques d'un ou plusieurs tissus. Leur activité leur confère cependant des rôles divergents dans la dégradation de la matrice ou au contraire dans l'accumulation de composants matriciels (fibrose). En effet, une TIMP inhibe préférentiellement une ou quelques métalloprotéase(s). Ainsi, le rôle global des TIMP dans un tissu et un état donné dépend de la combinaison entre la TIMP activée, les métalloprotéases cibles et leurs substrats dans ce tissu. On ne peut ainsi jamais affirmer en constatant l'activation d'une TIMP si celle-ci a un rôle plutôt fibrogène ou plutôt fibrolytique⁹¹.

Dans le foie, les TIMP 1, 2 et 3 sont les plus exprimées. Elles sont d'ailleurs relativement ubiquitaires, et très fortement exprimées dans les organes à fort renouvellement cellulaire (placenta, ovaires, endomètre, poumons et vessie). TIMP1 inhibe fortement de nombreuses MMP, mais inhibe mal les protéases transmembranaires, ADAMTS et ADAM. TIMP1 a un rôle plutôt protecteur vis-à-vis de la protéolyse matricielle et anti-inflammatoire⁹¹. TIMP2 joue aussi un rôle protecteur de la matrice vis-à-vis de la protéolyse, aussi bien dans le foie que dans les tissus cardiaque, musculaire et rénal. TIMP3 inhibe le remodelage de la matrice, et régule l'inflammation par inhibition d'ADAM17⁹². Enfin, TIMP4 est la moins étudiée des 4, mais semble aussi inhiber la protéolyse matricielle, notamment dans les poumons, l'appareil reproducteur féminin, les yeux et les tissus transplantés⁹¹.

Le rôle des TIMP est donc fortement dépendant du contexte spatio-temporel dans lequel elles sont exprimées, et il peut ainsi être pro- ou anti-fibrotique.

II.C.4. Régulation de l'activité des métalloprotéases par d'autres facteurs

Comme pour toutes les protéines, l'expression des protéases matricielles est régulée en premier lieu aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, par des modifications épigénétiques de l'ADN, la stabilité de l'ARNm, l'efficacité traductionnelle ou encore des régulations par micro-ARN. Vient ensuite une régulation lors du passage de la MMP de sa forme zymogène à sa forme active, ce qui peut se produire dans ou hors de la cellule (figure 23). Enfin, une régulation peut se faire via les composants matriciels eux-mêmes : par exemple, la fibronectine contribue à l'activation de la MMP2 et de la MT1-MMP⁹³. De même, les produits de dégradation des composants matriciels peuvent influencer l'activité des protéases, positivement ou négativement. Les dérivés de l'élastine participent à la suractivation des MMP2 et MT1-MMP, la protéine C réactive à celle des MMP2, MMP9 et MMP13⁹⁴, et les GAG sulfatés contrôlent l'activité de la MMP7⁹⁵. La glycoprotéine RECK ancrée à la membrane plasmique inhibe l'activité des MMP2, MMP9 et MT1-MMP⁹⁶, et le domaine NC1 du collagène XIX inhibe la MT1-MMP⁵⁸. Il est intéressant de constater qu'un composant de la MEC et les produits de sa dégradation ont des effets inverses sur l'activité de la protéase, à la manière d'une enzyme classique avec son substrat et son(s) produit(s). Par exemple, le collagène de type IV induit l'activation de la MMP2 dans des conditions tumorales, alors que sa région C-terminale (aussi appelée tumstatine) issue du clivage par la MMP9 inhibe l'activation de la MMP2⁹⁷. Enfin, l'endostatine issue du clivage du collagène de type XVIII par plusieurs MMP inhibe l'activité catalytique des MMP2, MT1-MMP, MMP9 et MMP13⁹⁸.

Enfin, des facteurs externes tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des facteurs de coagulation peuvent également influencer l'activité des métalloprotéases^{99,100}. Les mécanismes moléculaires de cette inhibition sont cependant encore très mal connus, bien que les avancées en dégradomique aient permis de clarifier le rôle des MMP.

En résumé, la régulation des MMP se fait à de nombreux niveaux (figure 23), de façon à créer l'environnement cellulaire le plus adapté à la fonction du tissu donné.

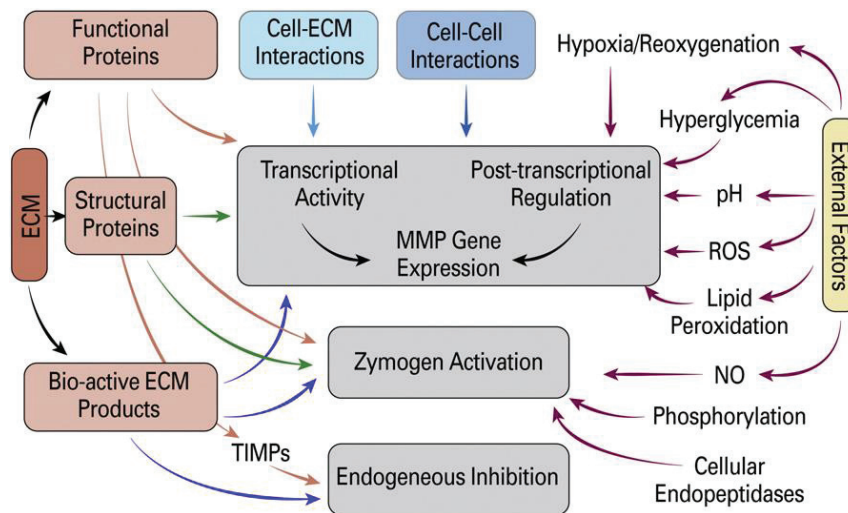


Figure 23 : Représentation schématique de la régulation multifactorielle des métalloprotéases au niveau de l'expression génique, de l'activation du zymogène et de l'inhibition endogène. D'après Gaffney et al. 2015⁵⁸.

Cet environnement est très finement régulé, et l'implication des très nombreux facteurs qui le composent et le structurent assure l'homéostasie, ou permet généralement la résolution de la plupart des pathologies. Malheureusement, si la pathologie est chronique, l'équilibre régissant la composition et la fonction de la MEC peut être rompu, du fait du stress persistant. Les déséquilibres et désordres s'accumulent alors, ce qui aboutit à un environnement matriciel anormal et à terme, à des dysfonctionnements cellulaires et tissulaires.

HEPATITE C

I. Epidémiologie

L'hépatite C est une maladie due à l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC ou HCV), qui se transmet par exposition à du sang contaminé. L'exposition a lieu lors d'injections (drogues intraveineuses), comportements (tatouages, piercings) ou soins (matériel mal stérilisé, réutilisation d'instruments à usage unique) à risque, ou lors de la transfusion de sang ou produits dérivés pour lesquels il n'y a pas eu de dépistage. Il existe 7 génotypes viraux, identifiés de 1 à 7, et de nombreux sous-types. Le taux d'infection et le génotype prévalent sont dépendant de chaque zone géographique¹⁰¹ (figure 24). Ainsi, l'Amérique du nord, l'Europe de l'ouest et du nord ainsi que l'Australie ont la prévalence virale la plus faible et sont principalement concernées par le génotype 1, tandis que l'Asie du sud-est, l'Asie centrale et l'Afrique du nord sont des zones fortement touchées par les génotypes 1, 3 et 4, respectivement. La prévalence virale la plus forte est enregistrée en Egypte où 22% de la population est infectée¹⁰². On considère que 120 à 130 millions de personnes, soit 3% de la population mondiale, sont actuellement infectés par le virus¹⁰¹, dont 71 millions de porteurs chroniques, et que 3 990 000 personnes meurent chaque année de cette infection et ses conséquences.

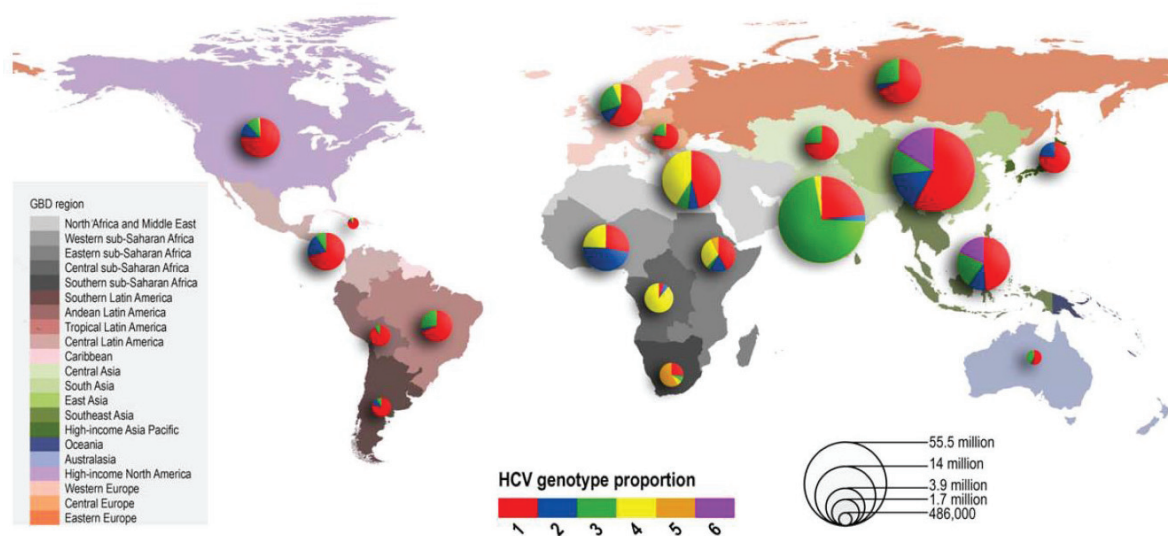


Figure 24 : Prévalence relative de chaque génotype du VHC par région GBD (Global Burden of Disease region, définie par l'OMS). La taille des diagrammes circulaires est proportionnelle aux nombres de cas séroprévalents¹⁰³. D'après Messina et al¹⁰²

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année. Cette infection est considérée comme un problème majeur de santé publique : après une période d'incubation de 2 à 24 semaines, l'infection est asymptomatique chez 85 à 90% des patients, dont

seulement 10 à 15% réussissent à résoudre l'infection¹⁰⁴. Chez les patients symptomatiques qui peuvent présenter des symptômes comme de la fièvre, de la fatigue, une baisse d'appétit, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, une coloration sombre des urines ou grisâtre des fèces, des douleurs articulaires et/ou un ictère (jaunissement de la peau et du blanc des yeux), 25% à 52% de ces patients résolvent l'infection. On considère que l'infection devient chronique dans environ 80% des cas totaux, et qu'elle induit la plupart du temps une fibrose hépatique qui évolue fréquemment vers la cirrhose hépatique, pouvant aboutir à un carcinome hépatocellulaire (CHC). L'évolution de la maladie à long terme varie d'un patient à un autre, mais certains facteurs aggravants ont néanmoins été identifiés : infection par le virus depuis plus de 40 ans, sexe masculin, co-infection avec le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH), index de masse corporelle élevé, foie adipeux et consommation d'alcool¹⁰¹. On considère qu'après 10 à 30 ans d'infection, 20 à 30% des patients développent une cirrhose hépatique qui peut être associée avec une défaillance de l'organe et/ou une décompensation suite à une hypertension portale se manifestant sous la forme d'ascites ou de saignements gastro-intestinaux par exemple. Chez ces patients cirrhotiques, le risque de mourir des complications de leur maladie est de 4% chaque année, et le risque de développer un CHC est de 1 à 5% chaque année également. 33% des patients atteints de CHC meurent dans l'année du diagnostic. Dans l'ensemble des patients cirrhotiques, le taux de survie à 5 ans est de 50%, et la décompensation hépatique est la première cause de transplantation hépatique¹⁰¹. Bien que des traitements antiviraux efficaces existent et permettent de guérir plus de 95% des patients traités, l'accès au diagnostic et aux thérapies ainsi que le vieillissement de la population actuellement infectée laisse prévoir une augmentation du nombre de cas de cirrhose induite par le VHC de 31%, et une augmentation du nombre de cas de CHC viro-induits d'environ 50%. En effet, seuls 5% des personnes infectées mondialement sont conscientes de leur sérologie, parmi lesquelles uniquement 5% ont accès aux traitements¹⁰⁵. Par conséquent, l'infection par le VHC représente encore un enjeu majeur de santé publique qui devrait conduire à de meilleures pratiques d'interventions pour identifier et traiter les patients infectés.

II. Le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est un petit virus à ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des *Flaviviridae* (on y trouve également les virus de la fièvre jaune et du Nil occidental), et est l'unique représentant du genre *Hepacivirus* chez l'humain. Il a été identifié en 1989 par l'équipe de Michael Houghton¹⁰⁶. Les particules virales sont enveloppées et ont une taille généralement supérieure à 70nm¹⁰¹. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont présentes sous forme d'hétérodimères à la surface de l'enveloppe virale recouvrant la capsidie qui protège le génome à ARN (figure 25).

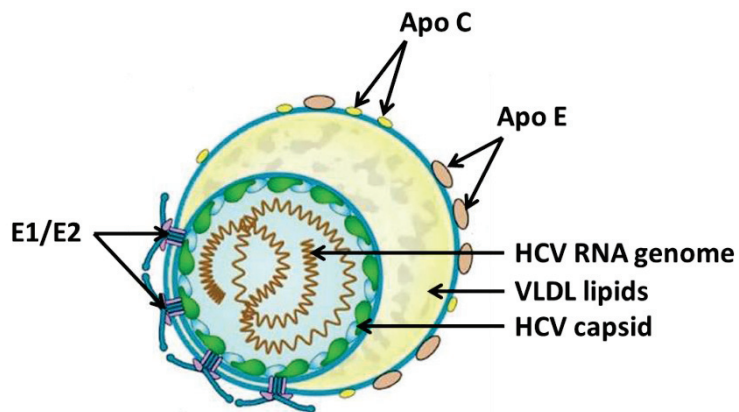


Figure 25 : Lipo-viro particule VHC (LVP). La particule virale est enrobée dans des lipides issus du métabolisme des VLDL tels que les triglycérides, ainsi qu'une majorité de phospholipides et d'esters de cholestérol. Une partie seulement de la surface de la particule virale est exposée.

D'après Aizawa et al, 2015.

La population des particules virales extracellulaires est de morphologie très hétérogène. Une large majorité des particules circulant dans le sang des individus infectés sont associées à des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) issues du métabolisme du cholestérol, et qui présentent à leur surface des protéines impliqués dans la régulation métabolique et la cohésion de la VLDL, les apolipoprotéines C et E. Ces particules virales portent donc le nom de « lipo-viro particules (LVP) ». Cette combinaison de composants d'origine virale et de constituants cellulaires est une « marque de fabrique » du VHC, et la raison pour laquelle il aura fallu plus de 25 ans pour réussir à visualiser ces LVP en microscopie électronique à transmission¹⁰⁷. Cependant, l'ensemble des études antérieures de biologie moléculaire sur le virus avait permis de proposer une organisation ultrastructurale proche de la réalité.

La taille de la couche de lipides présente autour de l'enveloppe virale variant au sein d'un même individu, ceci expliquerait l'hétérogénéité de la population de particules, et que seulement une fraction de la surface de l'enveloppe virale présenterait des glycoprotéines d'enveloppe. Chaque patient posséderait donc sa propre population virale, et le VHC ne serait en réalité pas défini par une taille ou une forme précise¹⁰⁷.

Le génome viral est long de 9600 nucléotides, et contient deux régions non traduites (UTR) 5'-UTR et 3'-UTR encadrant un seul cadre de lecture ouvert (ORF). Cet ORF contient, selon le génotype viral, 9030 à 9099 nucléotides et code pour une polyprotéine virale précurseur unique de 3010 à 3033 acides aminés (figure 26). La traduction a lieu dans le réticulum endoplasmique et est initiée par le site d'entrée interne ribosomique (IRES) en 5'-UTR et se fait de façon cap-indépendante. La polyprotéine virale est prise en charge par des protéases cellulaires et virales pour donner 10 protéines. Trois de ces protéines sont structurales et composent le virion : les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, et la protéine core (protéine de la capsid). Les sept protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont impliquées dans la morphogénèse de la particule, la réplication de l'ARN viral et la régulation des fonctions de la cellule infectée.

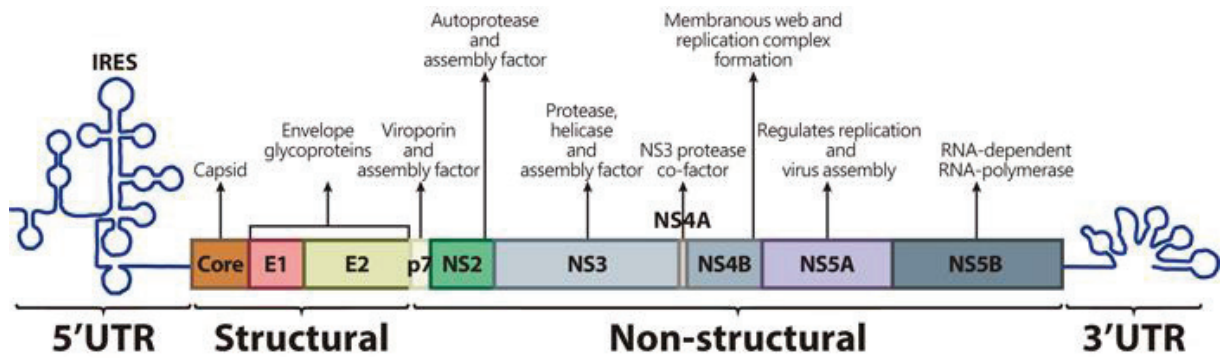


Figure 26 : Structure de l'ARN génomique du VHC et rôles des différentes protéines virales codées.

www.genetex.com

III. Cycle du VHC

Le virus de l'hépatite C est majoritairement transmis par voie sanguine et la contamination provient essentiellement des voies décrites ci-dessus. Cependant, il existe d'autres voies plus rares de transmission. Le taux de transmission mère-enfant est en général de 4,3%, et monte à 22,1% chez les mères co-infectées par le VIH. Cette transmission a lieu principalement au moment de l'accouchement, mais peut également survenir *in utero*^{108,109}. La contamination par voie sexuelle est controversée.

Le VHC est un virus hépatotrope humain qui infecte en grande majorité les hépatocytes¹¹⁰. Les particules virales arrivent par le sang dans le foie. L'endothélium des vaisseaux sanguins hépatiques est fortement fenestré, et certaines études ont démontré que des cellules immunitaires circulantes étaient capable de fixer le virus via certaines lectines^{111,112}, indiquant ainsi une possible voie de transport du virus à travers l'espace de Disse et jusqu'à la surface des hépatocytes via ces cellules capables de diapédèse. Cependant cette hypothèse n'a jamais été formellement démontrée, et repose principalement sur la comparaison avec le transport d'autres virus vers leurs cellules cibles (Influenza¹¹³, cytomégalovirus CMV¹¹⁴, VIH¹¹⁵).

III.A. Entrée virale

Comme pour de nombreux autres virus (HPV¹¹⁶, VIH¹¹⁷, HBV¹¹⁸, HSV¹¹⁹, CMV¹²⁰, virus de la Dengue DENV¹²¹), les protéoglycanes sont les premiers facteurs d'attachement du virus de l'hépatite C. Plus spécifiquement, l'interaction avec les HSPG syndécan-1^{122,123} (SDC1) et syndécan-4¹²⁴ (SDC4) a été formellement démontrée. Une étude suggère que le syndécan-2 serait également impliqué dans l'entrée du VHC¹²⁵, cependant ce HSPG semble être spécifique des cellules endothéliales et des fibroblastes. Il est possible que les cellules Huh7.5, très transformées, expriment le SDC2 à leur surface, mais ces résultats et les conclusions qui en découlent sont alors difficilement transposables à la réalité de l'infection *in vivo*. L'interaction entre les syndécans et la particule virale se ferait via les apolipoprotéines ApoE exposées à la surface des particules virales^{122,124}. Il s'ensuivrait alors une

hydrolyse partielle de la fraction lipidique de la LVP VHC par des lipases hépatiques résidentes de l'espace de Disse, permettant d'exposer les apolipoprotéines B (ApoB) initialement enchâssées dans la couche lipidique de l'enveloppe virale¹²⁶.

Ces apolipoprotéines ApoB peuvent alors interagir avec le récepteur aux lipoprotéines de faible densité LDL-R présent à la surface des hépatocytes, identifié comme l'un des premiers récepteurs du VHC¹²⁷. Le virus est ensuite reconnu par un autre de ses récepteurs, le scavenger receptor class B member 1 (SR-BI), via son interaction dans un premier temps avec les lipoprotéines à la surface de la LVP¹²⁸, le récepteur SR-BI participant physiologiquement à l'import de cholestérol dans l'hépatocyte à partir de lipoprotéines de haute (HDL), faible (LDL) et très faible (VLDL) densité. Ce rôle lui confère d'ailleurs la propriété de modifier la surface lipidique de la particule virale afin d'exposer plus amplement les glycoprotéines de surface E2^{129,130} qui vont alors pouvoir interagir avec le récepteur suivant, la tétraspanine CD81¹³¹. Cette protéine est la première à avoir été identifiée comme récepteur du VHC, et est physiologiquement impliquée dans des processus cellulaires tels que l'adhésion, la prolifération ou la différenciation. Nous avons montré qu'il existe une interaction entre SDC1 et CD81 post-attachement viral, et que ces deux facteurs d'entrée sont co-intériorisés avec la particule virale¹²³. La liaison entre la glycoprotéine E2 et le récepteur CD81 déclenche la phosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGFR) et transformant (TGF β -R), ce qui active des voies de signalisation intracellulaire qui induisent un regroupement des récepteurs viraux à la surface de l'hépatocyte, en particulier CD81 et claudine 1 (CLDN1)^{132,133}. Le récepteur à la transferrine TfR1 pourrait jouer un rôle dans l'entrée du virus après son attachement à CD81¹³⁴, il semblerait toutefois que le rôle de ce récepteur ou de son substrat soit plus marqué dans des étapes plus tardives de l'infection^{135,136}.

Les protéines des jonctions serrées claudine-1¹³⁷ (CLDN1) et occludine^{138,139} (OCLN) interviennent dans l'entrée du virus de l'hépatite C après son attachement à CD81. L'activation des voies de signalisation dépendantes de l'EGFR et du TGF β R induit la translocation de la particule virale et de certains de ses facteurs d'entrée vers les jonctions serrées (pôle apical de la cellule), via l'interaction entre CD81 et CLDN1. Il n'existe cependant aucune donnée expérimentale indiquant une interaction directe entre le virus et ces deux protéines des jonctions serrées, elles ne peuvent donc pas être considérées comme des récepteurs viraux au sens classique du terme. Une fois transféré au pôle apical de l'hépatocyte, le virus rencontre son dernier facteur d'entrée, le Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor (NPC1L1), essentiel à l'infection des hépatocytes par le virus¹⁴⁰. Ici encore le rôle précis de cette protéine dans l'entrée virale n'est pas bien connu.

Aucun des récepteurs du virus n'est spécifique des hépatocytes ou même plus largement du foie (figure 27). Ce serait donc une combinaison de ces facteurs d'entrée qui déterminerait le tropisme très restreint de ce virus, plutôt que la présence d'un récepteur spécifique, contrairement à d'autres virus (le transporteur de sels biliaires NTCP pour le virus de l'hépatite B par exemple¹⁴¹).

Gène	Expression tissulaire
SDC1	Epithélium
SDC4	Ubiquitaire
LDLR	Ubiquitaire
SR-BI	Surrénales, pancréas, foie
CD81	Ubiquitaire
CLDN1	Ubiquitaire
OCLN	Jonctions serrées (épithélium)
EGFR	Placenta, prostate, foie
TfR1	Erythrocytes, foie
NPC1L1	Ubiquitaire

Figure 27 : Expression tissulaire des récepteurs du VHC. D'après Ding et al. 2014¹³⁰

III.B. Internalisation du virus et réplication du génome

Le regroupement des récepteurs viraux à la membrane plasmique active l'entrée de la particule virale par endocytose clathrine-dépendante^{142,143}. La maturation, et donc l'acidification, de l'endosome transportant le virus déclenche un changement conformationnel dans les protéines d'enveloppe E1 et E2 qui permettent la fusion de l'enveloppe lipidique virale et de la membrane de l'endosome¹⁴³⁻¹⁴⁵, ainsi que la destruction de la capsid pour libérer le génome viral dans le cytoplasme de l'hépatocyte infecté. Cette matrice ARN est utilisée à la fois dans la réplication du génome viral, ainsi que dans la traduction pour la production de protéines permettant l'assemblage de nouvelles particules virales. La traduction de la polyprotéine virale a lieu dans le RE et est initiée par la fixation d'un ribosome sur le site de fixation interne ribosomique (IRES) en 5'UTR. Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires pour produire les protéines structurales et non-structurales mentionnées précédemment. La réplication de l'ARN viral aurait lieu dans ce qui est communément appelé le « réseau membranaire » (membranous web), une structure originaire du RE et issue de la fusion de multiples vésicules à simples et doubles membranes dont la biosynthèse est générée par l'infection elle-même¹⁴⁶. Les protéines virales néosynthétisées sont associées rapidement à ces membranes pour y former le complexe de réplication, constitué des protéines non structurales NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B¹⁴⁷. Ce complexe est responsable de la production de nouvelles copies du génome viral à travers un intermédiaire ARN de polarité négative, et nécessite le recrutement d'un microARN spécifique du foie, miR-122¹⁴⁸. Ce mécanisme de réplication viral dans un réseau de membranes est commun à d'autres virus dont le génome est porté par un ARN de polarité positive (le virus de la Dengue par exemple¹⁴⁹), et permettrait au virus d'échapper aux mécanismes de surveillance immunitaire innée dans la cellule infectée qui reconnaissent les structures de polarité négative.

III.C. Assemblage des nouvelles particules et sécrétion dans le milieu extracellulaire

L'assemblage des nouveaux virions comporte certaines étapes qui restent encore mal comprises. Néanmoins cette étape a lieu en lien étroit avec le métabolisme lipidique de la cellule, en particulier avec celui des gouttelettes lipidiques naturellement présentes dans l'hépatocyte, ainsi que celui des lipoprotéines. Ce lien particulier entre VHC et métabolisme des lipides est d'ailleurs mis en évidence par la mise en place du réseau membranaire. Parallèlement à la réplication du génome viral, les protéines structurales du virus sont traduites dans le RE. Les protéines core néosynthétisées s'associent aux gouttelettes lipidiques naissantes, et cette structure s'associe au complexe de réplication grâce à l'interaction entre la protéine core et la protéine non-structurale NS5A pour stimuler l'encapsidation du génome¹⁵⁰. La protéine NS2 joue également un rôle central dans l'assemblage des particules virales puisqu'elle interagit avec de nombreuses protéines : il semblerait que ce soit en effet l'interaction entre NS2 et les glycoprotéines E1 et E2 d'une part, et l'interaction entre NS2 et NS5A d'autre part qui permette de compléter l'étape d'enveloppement du virus et la finalisation de la nucléocapside^{151,152}. Enfin, la translocation d'une nucléocapside VHC au réticulum endoplasmique a lieu en même temps que la lipodation d'une protéine ApoB naissante dans le même compartiment. Ces deux éléments s'associent via une interaction entre apolipoprotéine et glycoprotéines virales pour former une LVP. Celle-ci mature alors dans la voie de sécrétion cellulaire pour s'associer aux VLDL grâce à l'interaction entre ApoE (à la surface des VLDL), ApoB et les glycoprotéines d'enveloppe virales. La fin de la maturation fait intervenir la fusion avec des gouttelettes lipidiques pour enrichir à différents degrés la LVP en triglycérides, ce qui explique l'hétérogénéité de densité dans une population virale¹⁵³ (figure 28).

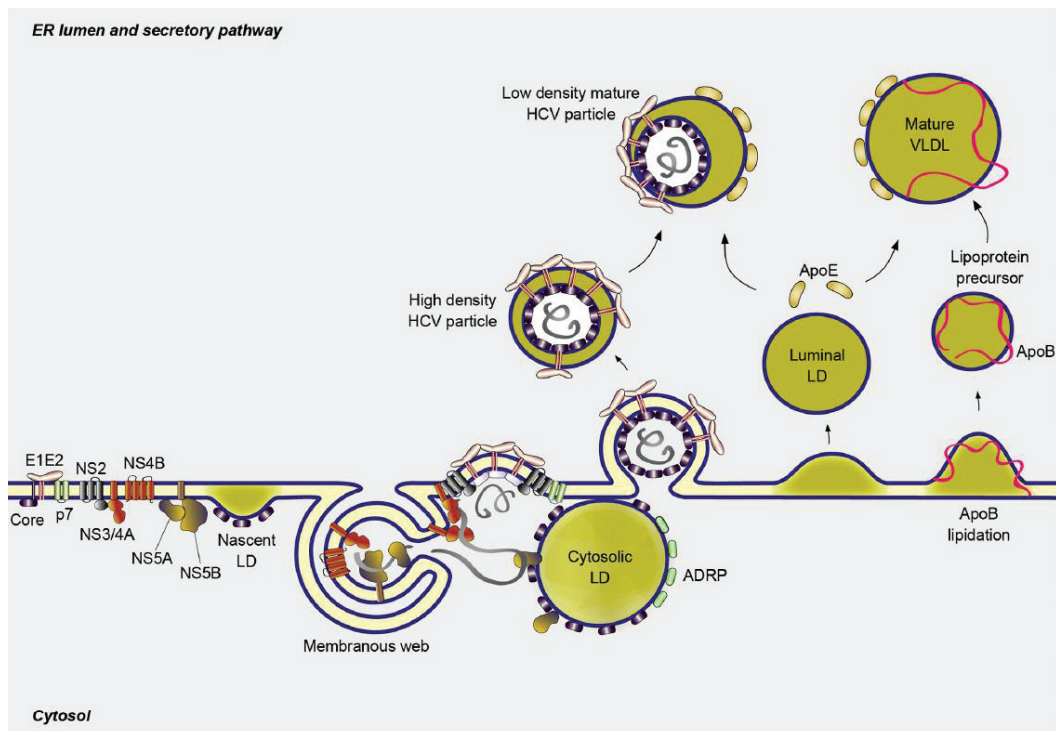


Figure 28 : Assemblage des nouveaux virions VHC. Les étapes finales induisent un détournement des intermédiaires lipidiques des VLDL en faveur de ces virions. D'après Dubuisson et Cosset, 2014¹⁴⁷.

La sécrétion des nouveaux virions est un mécanisme très mal compris. Initialement, le système de sécrétion endosomal ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), impliqué dans la voie dite de sécrétion régulée, a été identifié comme étant nécessaire à l'export des nouveaux virions¹⁵⁴, en partie par comparaison avec les mécanismes de sécrétion d'autres virus (HIV par exemple). Toutefois, une étude a récemment mis en évidence que la voie de sécrétion constitutive de l'appareil de Golgi serait préférentiellement empruntée par les particules néosynthétisées¹⁵⁵, supportée par le lien étroit existant entre réplication virale et synthèse des VLDL. Le passage par l'appareil de Golgi permet la maturation des protéoglycanes portés par le virus, ainsi que l'acquisition de sa densité finale¹⁴⁷.

Les nouveaux virions peuvent alors être exportés vers la circulation sanguine via les vaisseaux proches des hépatocytes, ou bien la contamination peut se faire entre deux cellules voisines (cell-cell spread) grâce à la présence des quatre récepteurs essentiels pour l'entrée du VHC : SR-BI, CLDN1, CD81 et OCLN¹³⁹. Cette seconde voie de transmission serait préférentiellement utilisée après l'infection initiale pour que celle-ci s'installe dans le temps et devienne chronique. Ce mode de transmission est confirmé par des expériences réalisées *in vitro* sur la lignée Huh7.5 d'hépatocarcinome^{156,157} et expliquerait comment le virus échappe à la surveillance immunitaire du foie, ainsi qu'à certains traitements antiviraux¹⁵⁸. Aucune de ces observations n'a cependant été démontrée *in vivo* chez l'homme.

La figure 29 récapitule le cycle du VHC.

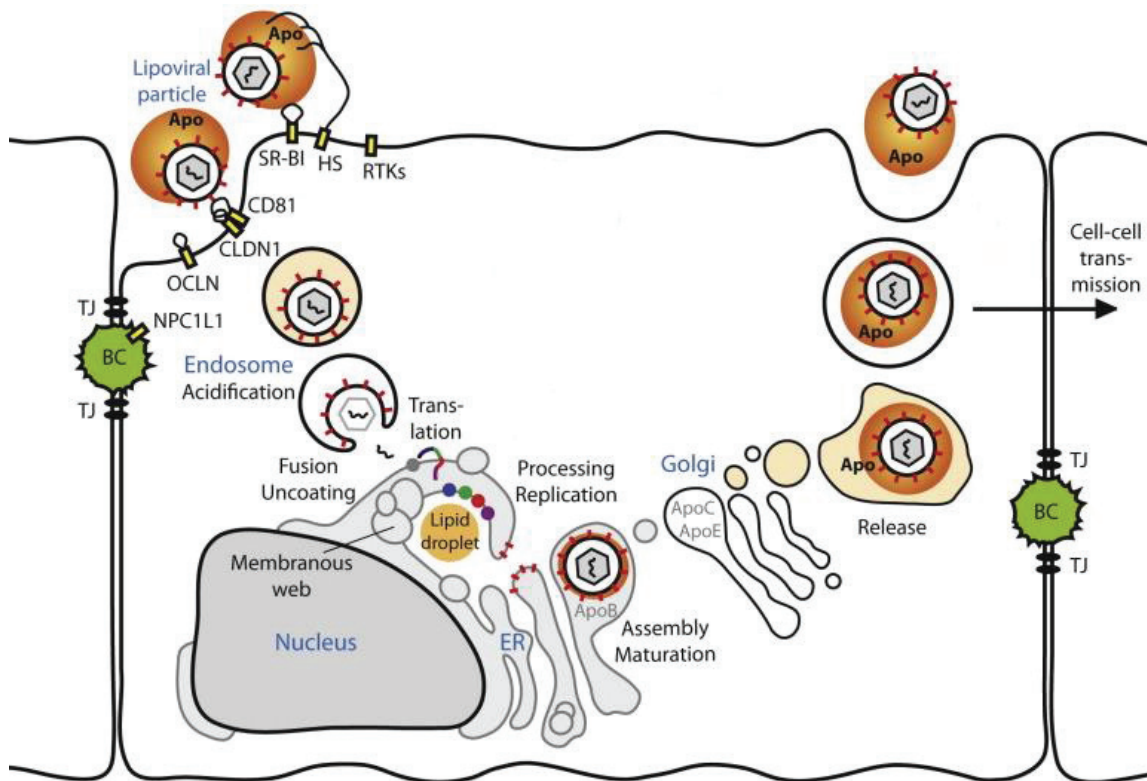


Figure 29 : Cycle complet du VHC. D'après Zeisel et al, 2013¹⁵⁹.

IV. Mise en place de la réponse immunitaire & inflammation spécifique du VHC

Les mécanismes viraux qui mènent à la mort cellulaire des hépatocytes infectés sont encore très mal compris en 2018. La théorie sur laquelle travaille la plupart des équipes est celle selon laquelle une large partie des effets cytotoxiques du virus seraient liés à la réponse immunitaire innée des cellules infectées. De nombreux senseurs cellulaires de l'immunité innée, les PRR (pour Pattern Recognition Receptors), reconnaissent les infections virales dans la cellule et déclenchent la sécrétion de signaux moléculaires pour l'activation d'une réponse immunitaire à ces infections. Il existe 3 classes majeures de PRR dans l'hépatocyte : les récepteurs Toll-Like (TLR), les récepteurs RIG-1-like (RLR) et les récepteurs à domaines d'oligomérisation nucléotidique ou récepteurs NOD-like (NLR). La réplication de l'ARN viral donne naissance à des structures double-brin aberrantes pour une cellule eucaryote humaine qui sont reconnues par TLR3, RIG-1 et plus récemment démontré NOD1¹⁶⁰, aboutissant alors à l'activation de la voie des MAP-kinases, la production d'interféron et l'activation de la voie NF- κ B¹⁰⁴ dans l'hépatocyte. Le virus peut également être reconnu à l'extérieur de l'hépatocyte par des cellules de l'immunité innée résidente du foie : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et les macrophages du foie, appelés cellules de Kupffer¹⁶¹. La figure suivante résume la reconnaissance du VHC par ces cellules.

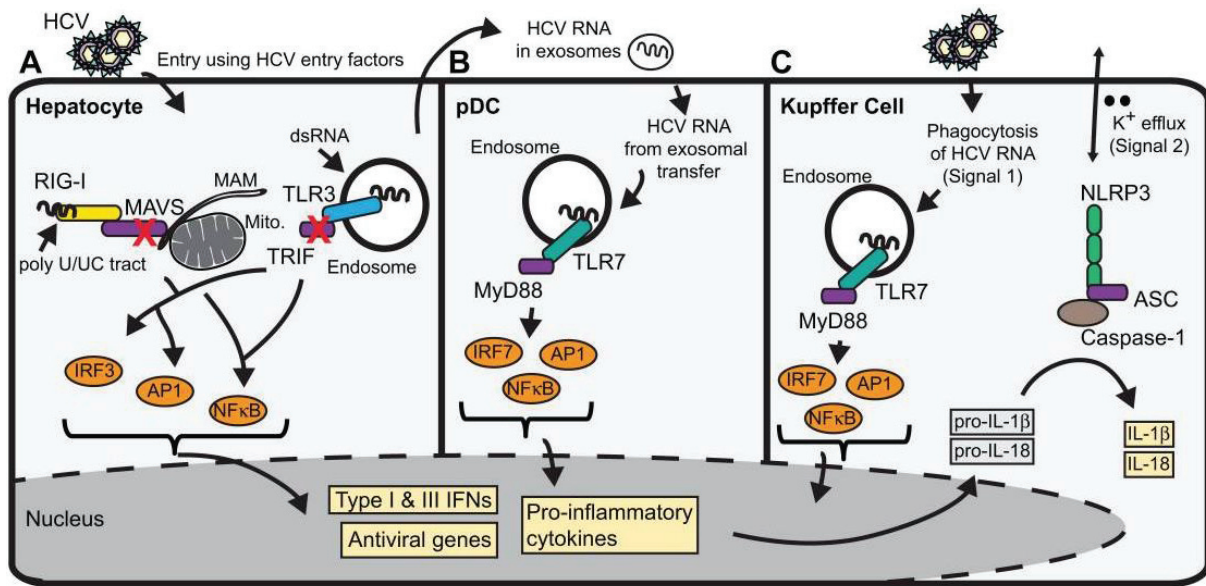


Figure 30 : Reconnaissance du VHC par l'immunité innée du foie. (A) Dans l'hépatocyte, l'infection est reconnue via les structures ARN virales par RIG-I et TLR3 qui activent alors le programme de réponse immunitaire innée aboutissant à la production d'interférons de type I et III et de cytokines pro-inflammatoires qui amplifient le signal en agissant de façon paracrine et autocrine. Les croix rouges indiquent des points où la réponse immunitaire peut être inhibée par le virus (protéase NS3/4A). (B) Le VHC est reconnu par les pDCs via TLR7 qui détecte la présence d'ARN viral dans les exosomes sécrétés par les cellules infectées, aboutissant à la sécrétion par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires. (C) le virus circulant dans le foie peut également être reconnu par les cellules de Kupffer qui phagocytent l'ARN viral et le reconnaissent également via TLR7, aboutissant à une activation complète de l'inflammasome via la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18. D'après S.M.Horner, 2015¹⁶¹.

Cette reconnaissance de l'infection virale, qui ne permet pas de l'éliminer dans la grande majorité des cas, induit cependant un état inflammatoire persistant dans le foie. Ceci aboutit à la création d'un environnement très propice à la progression de la maladie, concernant aussi bien la fibrose, la cirrhose que le CHC.

V. Traitements anti-viraux

V.A. Entre 1989 et 2011

Au moment de la découverte du virus en 1989, le traitement antiviral de référence était l'injection d'interféron- α seul, et permettait d'obtenir un taux de réponse virologique soutenue (Sustained Virologic Response, SVR) de moins de 20%. Cette réponse correspond à une période d'au moins 6 mois pendant laquelle le génome du virus n'est plus détecté dans le sang du patient sous traitement. En 1998, la ribavirine commence à être combinée à l'interféron pour le traitement de l'hépatite C. Cet analogue nucléosidique de la guanosine permettait alors d'obtenir une SVR dans 41% des cas. Puis en 2002,

l'interféron fut modifié chimiquement, pegylé, pour augmenter sa demi-vie et ainsi maintenir une concentration sérique plus stable de la molécule, en adéquation avec le cycle viral du VHC. La SVR était alors obtenue dans environ 55% des cas après 24 à 48 semaines de traitement, mais ce taux variait fortement d'un génotype viral à l'autre (80% chez les patients atteints par un virus de génotype 2 ou 3, seulement 50% chez les patients atteints de génotype 1, le plus commun en Europe). Les effets de ces traitements, en particulier de l'interféron, étaient une diminution de la réplication virale, une induction d'un état antiviral dans les cellules non-infectées, une augmentation de la lyse des cellules infectées et une inhibition de la fibrogenèse hépatique. Ces effets, bien que positifs, reflètent un état inflammatoire exacerbé qui était également à l'origine d'effets secondaires dramatiques pour la qualité de vie des patients : syndrome pseudogrippal après l'injection (fièvre, arthralgie, céphalées), manifestations générales (perte de poids, malaises) et cutanées (alopécie, prurits, éruptions cutanées), ainsi que des manifestations cognitives (apathie, irritabilité, dépression, bouffées délirantes)¹⁶². De nombreux patients ont alors préféré arrêter le traitement, et la mise sur le marché au début des années 2010 de molécules antivirales spécifiques du VHC a complètement révolutionné le traitement de l'hépatite C.

V.B. Depuis 2011

La commercialisation du bocéprévir (Merck) et du télaprévir (Janssen) en 2011 a marqué le début du développement d'agents antiviraux à action directe (AAD) qui visent spécifiquement des protéines virales du VHC¹⁶³. Ces molécules ont d'abord été utilisées en trithérapie avec l'interféron et la ribavirine, pour finalement abandonner les deux derniers et arriver à des thérapies combinatoires d'AAD seuls qui permettent aujourd'hui d'atteindre une SVR dans plus de 95% des cas, après seulement 8 à 16 semaines de traitement. L'OMS recommande actuellement l'utilisation de sofosbuvir, daclatasvir et ledipasvir en mono- ou co-traitements, mais de nombreuses autres molécules existent ou sont en cours de développement (figure 31). Le sofosbuvir (commercialisé sous le nom de Sovaldi chez Gilead), inhibiteur de la polymérase NS5B (analogue nucléotidique), reste l'antiviral de référence dans les laboratoires de recherche, et constitue l'une des premières molécules utilisées sans combinaison à l'interféron, avec une efficacité pangénotypique. En France, le dernier AAD arrivé sur le marché, en mars 2018, est le Maviret (combinaison de glecaprevir et pibentrasvir) commercialisé par le laboratoire américain AbbVie, premier médicament disponible en pharmacie, permettant enfin aux patients de s'éloigner du milieu hospitalier pour leur traitement¹⁶⁴.

L'opinion publique a donc tendance à considérer que l'hépatite C est sur le point d'être éradiquée. Cette affirmation n'est cependant pas correcte : seuls les pays développés peuvent offrir un accès aux soins à tous leurs ressortissants malades, et encore à des coûts extrêmement élevés. En effet, le prix d'un traitement au Maviret pour atteindre une SVR a été initialement négocié à 28 000€ par patient en France en mars 2018, et beaucoup de molécules antivirales ne sont pas disponibles en pharmacie de ville à cause de leurs prix de vente. En ce qui concerne les autres pays dans lesquels les systèmes de santé

publique sont peu ou pas développés, l'accès à ces traitements est très limité voire nul ; les individus infectés continuent donc de voir leur maladie progresser et restent source de contagion. Enfin, ces molécules visant des cibles exclusivement virales, elles sont/seront donc toutes confrontées à des problèmes d'émergence de résistance. Plusieurs molécules antivirales à cibles cellulaires de l'hôte sont en cours de développement (le Miravirsén du laboratoire Santarius par exemple qui cible miR-122, actuellement en phase II)¹⁰¹, cependant aucune n'a encore passé les tests permettant une mise sur le marché. Pour toutes ces raisons, on ne peut à l'heure actuelle pas considérer que l'hépatite C est une infection appartenant au passé.

Nom de la molécule (triés par cible virale)	Laboratoire	Phase
<u>Inhibiteurs de la protéase NS3/4A</u>		
Vaniprévir	Merck	III
Voxilaprévir	Gilead	III
Glecaprevir	AbbVie	III
Sovaprevir	Achillion	II
<u>Analogues Nucléosidiques inhibiteurs de la polymérase NS5B</u>		
MK-3682	Merck	II
ACH-3422	Achillion/Janssen	II
<u>Inhibiteurs de la polymérase NS5B non analogues nucléosidiques</u>		
Beclabuvir	Bristol-Myers Squibb	III
Setrobuvir	Anadys/Roche	II
<u>Inhibiteurs de NS5A</u>		
BMS-824393	Bristol-Myers Squibb	II
PPI-461 et PPI-668	Presidio	II
Pibrentasvir	AbbVie	III
Ruzasvir	Merck	II

Figure 31 : AAD de seconde génération sélectionnés. Les laboratoires et phases de développement sont indiqués. Pour rappel, une phase II correspond à l'étude de l'efficacité du composé sur un petit groupe d'individus malades, et la phase III évalue cette efficacité et la tolérance sur un effectif beaucoup plus large. C'est également à cette phase que se fait la demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM). D'après Morozov et al, 2018¹⁰¹.

PATHOGENESE DE L'HEPATITE C

L'infection par le VHC entraîne fibrose et cirrhose hépatique, et prédispose au développement d'un carcinome hépatocellulaire. Elle est également liée au développement de troubles métaboliques comme l'hypolipidémie, la stéatose hépatique, la résistance à l'insuline et le diabète. Toutes les étapes du cycle viral sont fortement associées au métabolisme lipidique, depuis l'entrée faisant appel à des récepteurs de lipoprotéines jusqu'à la sécrétion de nouvelles particules virales en détournant la machinerie de production des VLDL. Deux protéines virales, la protéine de capsid C et la protéine non structurale NS5A interagiraient particulièrement avec le métabolisme des lipides et du glucose dans les hépatocytes infectés¹⁶⁵. De plus, la réplication du virus ayant lieu dans des compartiments cellulaires fortement liés à ces métabolismes (RE et appareil de Golgi), celle-ci entraîne une augmentation du stress oxydant dans ces organites et perturbe donc indirectement le métabolisme qui y a lieu. On assiste donc à une cascade d'altérations du métabolisme systémique chez les individus infectés chroniquement.

Toutefois, les études réalisées chez les patients infectés sont souvent conflictuelles concernant les altérations métaboliques. Ceci résulte très probablement de la variété inter-individus qui prédispose chacun différemment au développement de ces pathologies, quelle qu'en soit la cause. La mise sur le marché depuis 2014 de molécules antivirales très efficaces devrait néanmoins permettre d'observer la disparition ou non de ces troubles métaboliques après clairance virale, et ainsi aider à déterminer précisément les liens de cause à effet. Il est intéressant de noter que ces troubles métaboliques sont bien moins associés à l'infection par le virus de l'hépatite B que par le VHC, soulignant encore une fois que le VHC induit spécifiquement des altérations métaboliques.

I. Pathogénèse du VHC sur le métabolisme des sucres

I.A. Fonctionnement physiologique

Le glucose est métabolisé dans l'organisme en d'autres composés chimiques à l'origine de voies métaboliques variées. Il pénètre dans la cellule et dans différents compartiments cellulaires grâce aux transporteurs, représentés en grande majorité par la famille GLUT (ou SLC2A). Une fois dans la cellule, le glucose peut être utilisé comme source d'énergie par le processus de glycolyse pour la production de pyruvate (source d'énergie cellulaire) ou par la voie des pentoses phosphates pour produire les intermédiaires NADH, ribose et érythrose, pour produire respectivement les acides gras et le cholestérol, les nucléotides et les acides aminés aromatiques. Le glucose peut également être utilisé dans la voie des hexosamines pour produire des sucres particuliers utilisés dans les modifications post-traductionnelles de nombreuses protéines telles que les protéoglycane. Le produit de cette voie est l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-N-GlcNAc). Le glucose est également utilisé comme matière première pour

la production de nombreux autres sucres nucléotidés présents dans les GAG, comme l'UDP-acide glucuronique ou l'UDP-xylose grâce aux enzymes UGDH et XYLT2 (vu précédemment).

I.B. Altérations du métabolisme glucidique par le VHC

L'infection par le VHC entraîne une diminution de l'expression du transporteur GLUT2 dans les hépatocytes, ainsi qu'une augmentation de l'expression de deux enzymes limitantes pour la gluconéogenèse : la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6P)^{166,167}(figure 32). L'expression de ces deux enzymes est régulée par le facteur de transcription FoxO1, dont la phosphorylation est diminuée dans les cellules infectées, ce qui entraîne son accumulation nucléaire et donc son activité. Il semblerait que ce soit la protéine virale NS5A qui intervienne dans le processus de suractivation de FoxO1, ceci reposant principalement sur une étude d'activation transcriptionnelle de gènes cibles de FoxO1 sous système de surexpression de la protéine NS5A. Par ailleurs, l'infection par le VHC *in vitro* entraîne également une répression de l'expression de la glucokinase GK intervenant dans la glycolyse, signifiant que le virus entraîne une diminution de ce procédé cellulaire.

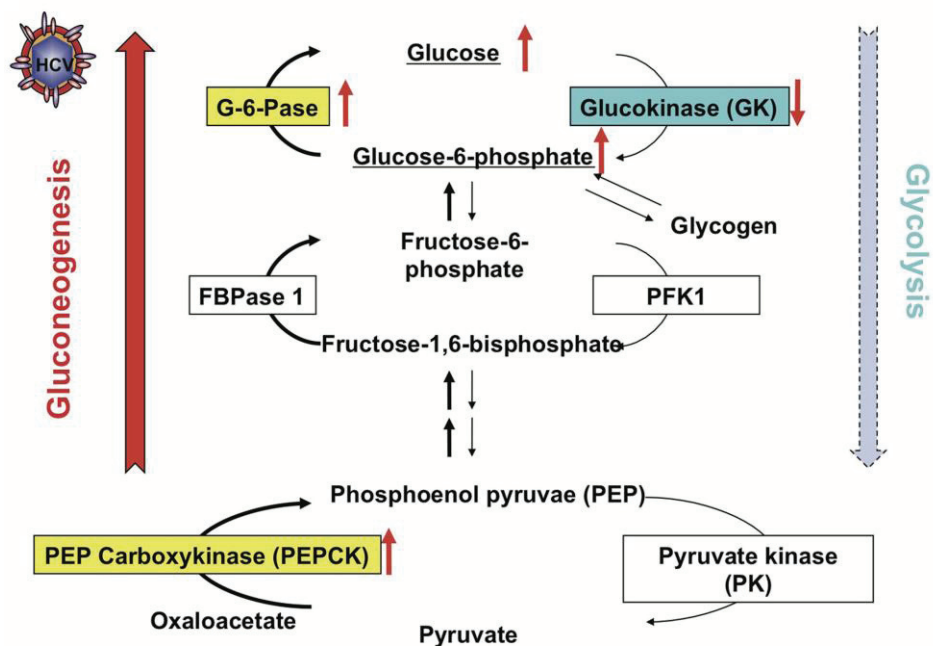


Figure 32 : Régulation de la gluconéogenèse et de la glycolyse dans des cellules infectées par le VHC. L'infection stimule la gluconéogenèse par activation transcriptionnelle des enzymes de la voie, et inhibe la glycolyse par le procédé inverse. D'après Shoji et al, 2012¹⁶⁷.

Plus globalement, les protéines virales s'associant avec le RE et les mitochondries, l'infection augmente le stress oxydant dans les cellules¹⁶⁸. Cependant le virus entraîne la suppression de ce stress oxydant, notamment en stimulant l'expression de la glutathione peroxydase 4 (GPx4)¹⁶⁹. Le stress du RE induit par l'infection résulte en l'augmentation de l'expression du facteur PGC-1 α (peroxisome proliferator-

activated receptor-gamma coactivator 1 α), celui-ci étant connu pour jouer un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire et lié au développement de l'obésité ou du diabète de type 2¹⁷⁰. La protéine core induit la dégradation protéasomale des récepteurs de l'insuline IRS-1 et IRS-2, ce qui bloque la signalisation intracellulaire de cette hormone et contribue à l'insulinorésistance observée chez certains patients¹⁷¹. Parallèlement, la protéine virale NS5A stimule la phosphorylation de l'IRS-1, bloquant ainsi son activité. Cette insulinorésistance est préférentiellement observée chez les patients infectés avec le VHC de génotype 1, 2 et 4 comparé à ceux infectés avec le virus de génotype 3¹⁷²⁻¹⁷⁴, soulignant encore une fois que ce génotype viral a une pathogenèse bien particulière qui dérégule plus fortement le métabolisme lipidique.

Des études de protéomique et de transcriptomique sur des cellules infectées par le VHC ont démontré que l'infection affectait très précocément la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et le cycle de Krebs (citric acid cycle en anglais). Ces changements favorisent l'activité de biosynthèse de la cellule infectée pour soutenir la réplication et la propagation virale, et sont suivis d'un effet compensatoire de la cellule afin de maintenir l'homéostasie et la viabilité cellulaire pendant l'infection. Elle peut donc être suivie d'un retard dans la progression du cycle cellulaire lié à une tentative de rediriger les substrats cellulaires vers un objectif énergétique plutôt que celui de fournir au virus les composants cellulaires nécessaires à sa réplication¹⁷⁵. A titre d'exemple, le cycle de Krebs est facilité dans les cellules infectées au détriment de la glycolyse afin de produire une quantité accrue d'acides aminés¹⁷⁶, corrélant avec l'observation d'une concentration diminuée en glucose intracellulaire¹⁷⁷.

I.C. Effets des traitements antiviraux sur le métabolisme du glucose

Contrairement aux nombreux lipides qui peuvent être dosés dans le sang chez les patients et ainsi donner une vision plus large de leur métabolisme, celui des glucides ne peut être estimé que par le dosage du glucose et par extension le dépistage d'insulinorésistance ou de diabète de type 2. Ces deux maladies sont fortement associées à l'hépatite C, de nombreuses études ayant démontré leur prévalence chez les patients infectés ces 20 dernières années¹⁷⁸. La première génération de traitement antiviral à base d'interféron et de ribavirine permettait de réduire l'incidence des manifestations extrahépatiques, mais ces observations sont encore une fois biaisées par les forts effets secondaires de ces molécules, notamment sur les voies digestives. En ce qui concerne les nouveaux traitements antiviraux à action directe, la réponse virologique soutenue est associée à une amélioration de l'insulinorésistance chez certains patients, ainsi qu'une diminution de la glycémie post-prandiale¹⁷⁹. Néanmoins, le nombre réduit des études portant sur ce sujet ne permet pas encore de tirer des conclusions définitives en ce qui concerne ces traitements, la seule certitude étant qu'ils n'aggravent pas la situation.

II. La fibrose hépatique liée à l'hépatite C

La fibrose hépatique est définie comme l'accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (ECM), tels que des collagènes, la fibronectine, l'élastine et les protéoglycanes. On estime que la quantité de ces composants augmente de 2 à 5 fois¹⁸⁰. Il y a alors une redistribution des quantités relatives de chaque composant matriciel, et bien que la fibrose soit un évènement biologique majeur en soit, cette redistribution s'accompagne également de phénomènes tels que la distorsion architecturale du foie, la régénération des cellules hépatiques et la réorganisation vasculaire du tissu.

L'accumulation de composants de la matrice s'accompagne aussi d'une modification du phénotype des cellules endothéliales qui perdent les pores permettant les échanges caractéristiques entre le sang et les cellules hépatiques ; on parle de capillarisation des sinusoides. Ces échanges sont donc fortement perturbés, et ceci couplé à des modifications de la composition de l'ECM, les communications cellulaires sont fortement perturbées. La MEC hépatique étant par ailleurs un réservoir de molécules de signalisation telles que les cytokines ou chimiokines, une altération de sa composition rajoute aux perturbations de communication cellulaire, et à plus grande échelle à la perturbation des fonctions hépatiques.

Dans le cas de l'hépatite C, la fibrose est considérée comme une réponse du foie à l'infection chronique : celle-ci dérégule directement des voies de signalisation et des voies métaboliques via l'expression de protéines virales, ainsi qu'indirectement puisque l'infection par le VHC induit une réponse immunitaire antivirale inflammatoire qui perdure dans le temps. Les cellules étoilées (HSC) sont des éléments-clef de la fibrogenèse lorsqu'elles sont activées et prennent un phénotype myofibroblastique (décrit précédemment). Elles deviennent la source principale des composants matriciels déposés en excès dans l'espace intercellulaire et participent donc au déséquilibre de la balance synthèse/dégradation qui maintient l'homéostasie de l'ECM (figure 33). On parle alors de dépôt de tissu cicatriciel dans le foie infecté. L'initiation de l'activation des HSC se fait de façon paracrine par les cellules voisines, telles que les hépatocytes infectés ou les cellules endothéliales qui sécrètent dans la matrice des espèces réactives de l'oxygène par exemple. Cette activation est en retour maintenue en réponse aux signaux secondaires émis par ces même cellules : des chimiokines et cytokines inflammatoires ou des signaux de prolifération ou fibrogènes¹⁸¹.

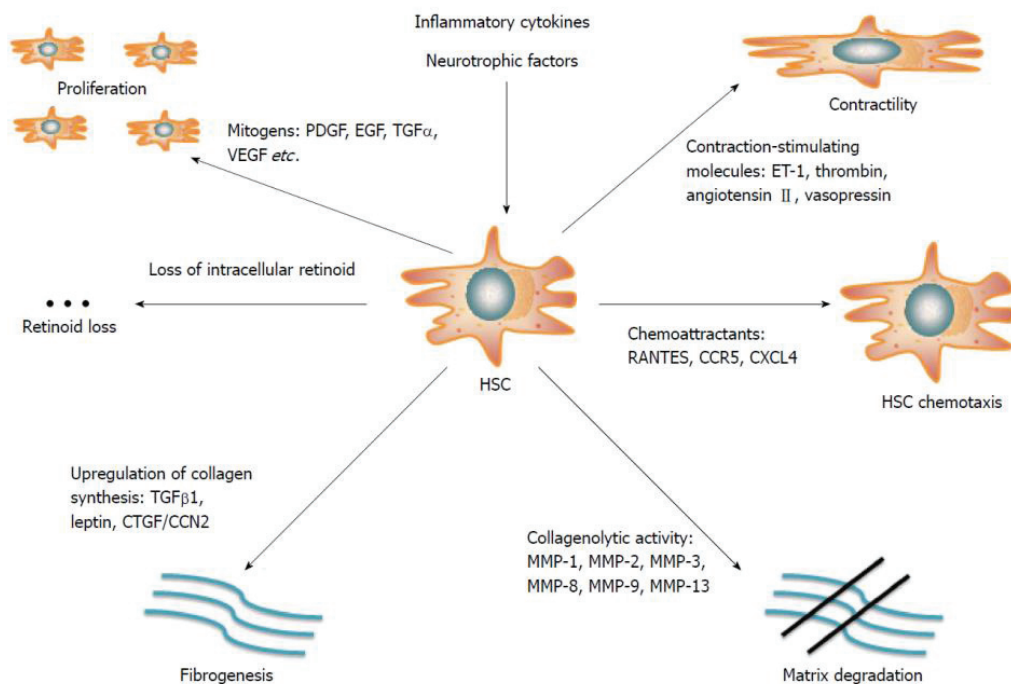


Figure 33 : Les cellules étoilées du foie jouent un rôle central dans la fibrogenèse. Lorsque le foie subit une blessure, ces cellules prennent un phénotype prolifératif et contractile de myofibroblaste. Les HSC activées sont la source principale de collagènes et autres composants de la MEC. Plusieurs molécules et voies de signalisation régulent l'équilibre existant entre dépôt et dégradation des protéines de la matrice. HSC : cellules étoilées ; ECM : matrice extracellulaire ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; EGF : facteur de croissance épidermique ; TGF : facteur de croissance transformant ; VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial ; CCR5 : récepteur de C-C chimiokine de type 5 ; MMP-2 : métalloprotéase matricielle 2. D'après Sebastiani et al, 2014¹⁸².

II.A. Activation des cellules étoilées au cours de l'hépatite C

II.A.1. Effets directs de l'infection

Il est généralement admis que les cellules étoilées ne sont pas permissives à l'infection par le VHC¹⁸³, bien que des résultats récents semblent indiquer une infection de HSC primaires isolées de patients ayant subi une résection hépatique¹⁸⁴. Cette infection *in vitro* réalisée avec le modèle JFH1 particulièrement virulent du VHC est cependant très faible dans ces cellules et ne perdure pas. Ces observations contradictoires proviennent probablement de l'utilisation *in vitro* de lignées cellulaires différentes, de cellules primaires dans des états d'activation différents et maintenues en conditions de culture différentes. Néanmoins, il existe une forte communication entre ces cellules et les hépatocytes, notamment par des exosomes qui peuvent transporter des protéines virales vers les HSC¹⁸⁵. De même, il a été démontré que les cellules étoilées ont la capacité de capter les corps apoptotiques d'hépatocytes

infectés, les mettant de fait en contact avec des protéines virales sans qu'elles soient elles-mêmes infectées¹⁸⁶.

La protéine core du VHC active préférentiellement des voies de signalisations pro-mitogènes dans les cellules étoilées, tandis que les protéines non structurales NS3 et NS5A activent des voies de signalisation pro-inflammatoires. Core et NS3 induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et en ROS¹⁸⁷. L'induction de l'ostéopontine par le calcium et les ROS contribue à la transition épithélio-mésenchymateuse des hépatocytes¹⁸⁸. Les protéines core, NS3 et NS5A induisent également du stress oxydant dans les hépatocytes par l'activation d'une enzyme de synthèse des ROS, la NADH oxydase¹⁸⁹⁻¹⁹¹, et la répression d'une enzyme d'élimination de ces ROS, l'hème oxydase 1 (HO-1)^{192,193}. Ces protéines virales induisent également l'expression du TGF β , facteur pro-fibrotique majeur^{194,195}.

La glycoprotéine d'enveloppe E2 est un autre facteur viral fibrogénique. *In vitro*, elle provoque l'activation de la MMP2 dans les HSC après avoir reconnu CD81 dans ces cellules, ce qui résulte en la dégradation de la MEC physiologique autour des cellules infectées et pourrait favoriser l'infiltration de cellules de l'inflammation dans ces zones¹⁹⁶.

Enfin, une étude plus récente a démontré que les hépatocytes infectés sécrétaient un facteur particulier, l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1), qui est capable de se fixer à la surface des cellules étoilées voisines et de stimuler la voie de signalisation JNK pour activer l'expression de l' α SMA, protéine-clef du phénotype d'activation des HSC¹⁹⁷.

II.A.2. Effets indirects de l'infection

La réponse inflammatoire médiée par des cytokines, facteurs de croissance et chimiokines joue un rôle important dans la fibrogenèse hépatique, et participent à la régulation de l'activation des HSC.

L'induction du PDGF et la mobilisation cellulaire conséquente du calcium a un effet mitogène sur les cellules étoilées^{198,199}. Le TGF α sécrété par les cellules immunitaires et l'activation du récepteur à l'EGF ont également un effet prolifératif sur les HSC^{200,201}. De même, l'induction du VEGF contribue à l'activation et la prolifération des HSC, ainsi qu'à l'angiogenèse hépatique, faisant de ce facteur de croissance un effecteur fibrogène majeur²⁰².

Parallèlement à ces facteurs prolifératifs, les cytokines jouent également un rôle important dans la production des composants de la matrice et sont positivement régulés suite à l'infection par le VHC. Le TGF β est la cytokine ayant l'effet fibrogénique le plus fort, stimulant la production de collagène suite à l'activation de la voie de signalisation SMAD²⁰³⁻²⁰⁵. Le facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF et l'adipokine leptine favorisent également la fibrogenèse par activation de la signalisation du

TGF β ^{206,207}. La leptine est également un suppresseur de PPAR γ , un récepteur nucléaire anti-fibrotique capable d'éteindre l'activation des cellules étoilées et maintenir leur quiescence²⁰⁸.

Les chimiokines sont aussi capables de favoriser la fibrogenèse en stimulant le chimiotaxisme des cellules étoilées et en amplifiant la réponse inflammatoire. Les HSC expriment de nombreux récepteurs et sécrètent beaucoup de cytokines²⁰⁹ dont le rôle dans la fibrogenèse est encore étudié. La chimiokine RANTES (ou CCL5) active la voie NF κ B via son récepteur CCR5 dans les cellules étoilées pour promouvoir des effets chimiotactiques²¹⁰. Les chimiokines CXCL9 et CXCL4 ont quant à elles des effets antagonistes puisque la première est anti-fibrotique et la deuxième pro-fibrotique^{211,212}.

Certains facteurs neurochimiques peuvent favoriser la fibrogenèse induite par les HSC. Des voies de signalisation cellulaire sont activées dans le système neuroendocrine en réponse à l'inflammation chronique dans le foie. Les opioïdes endogènes peuvent stimuler la prolifération des cellules étoilées et favoriser le dépôt de collagène²¹³, tandis que l'activation du récepteur CB1 par les cannabinoïdes dérivés de HSC ainsi que la stimulation de la voie PDGF dans ces cellules par la sérotonine favorisent la fibrose^{214,215}.

Enfin, le stress oxydant joue un rôle primordial dans la fibrose hépatique. Les corps apoptotiques « phagocytés » par les cellules étoilées résultent en l'activation de la NADPH oxydase et ceci mène à la génération de ROS capables d'activer les cellules étoilées, les hépatocytes et les cellules de l'inflammation pour promouvoir le dépôt de composants matriciels²¹⁶⁻²¹⁸. L'ADN des hépatocytes apoptotiques peut également interagir avec le TLR9 dans les HSC et stimuler la production de collagène dans la matrice²¹⁹.

II.B. Altération de la composition matricielle suite à l'infection par le VHC

II.B.1. Stades de fibrose hépatique

Les patients chroniquement infectés ont un statut fibrotique évalué selon différentes méthodes. A l'origine, seule la biopsie hépatique permettait de faire ce diagnostic, mais les techniques ayant évolué, de plus en plus de médecins se tournent vers des méthodes non-invasives telles que l'élastographie²²⁰ grâce au Fibroscan®. Plusieurs systèmes existent pour classer les patients en fonction de la sévérité de leur maladie, et reposent sur des observations physiopathologiques²²¹. Trois systèmes de classement principaux existent pour les patients chroniquement infectés par le VHC : le score IASL (International Association for the Study of the Liver), le score Batts-Ludwig et le score Metavir (le plus utilisé) (figure 34).

IASL		Batts-Ludwig	Metavir
Grade			
Chronic hepatitis with minimal activity		Grade 1	A1
Chronic hepatitis with mild activity		Grade 2	A1
Chronic hepatitis with moderate activity		Grade 3	A2
Chronic hepatitis with marked activity		Grade 4	A3
Chronic hepatitis with marked activity and bridging or multiacinar necrosis		Grade 4	A3
Definition			
	IASL	Batts-Ludwig	Metavir
Stage			
No fibrosis	No fibrosis	Stage 0	F0
Fibrous portal expansion	Mild fibrosis	Stage 1	F1
Few bridges or septa	Moderate fibrosis	Stage 2	F2
Numerous bridges or septa	Severe fibrosis	Stage 3	F3
Cirrhosis	Cirrhosis	Stage 4	F4

Figure 34 : Systèmes simples pour la classification de la fibrose hépatique. Les équivalences sont données pour les scores IASL, Batts-Ludwig et Metavir. D'après Goodman, 2007²²¹.

On considère globalement pour le score Metavir qu'un patient au stade F0 n'a pas encore développé de fibrose. Les patients aux stades F1 et F2 ont une fibrose faible à modérée, ceux au stade F3 ont une fibrose sévère et les patients au stade F4 ont développé une cirrhose.

Peu d'études existent sur la composition de la MEC suite à l'infection par le VHC. La grande majorité de ces études porte sur la composition en protéines fibrillaires (collagènes, fibronectine, élastine...), et presque aucune d'entre elle ne porte sur les protéoglycanes ou autres composants matriciels dans un contexte d'infection chronique.

II.B.2. Composants matriciels et MMP dans la fibrose hépatique liée à l'hépatite C

Dans des échantillons décellularisés de foie de patients infectés, l'évolution de la fibrose (du stade F1 au stade F4) est caractérisée par l'accumulation de collagènes de type I et III et d'élastine²²². Au stade terminal de fibrose/début de cirrhose (F4) l'élastine est accumulée de manière drastique, ce qui s'accompagne d'une diminution des taux de collagènes, reflétant ainsi un changement majeur dans la composition et l'élasticité du tissu infecté. Une autre étude réalisée sur le plasma de patients chroniquement infectés concerne la quantification de la présence de fragments de collagènes circulants²²³. Le marqueur du collagène de type III est plus élevé dans le sang des patients au stade F2 de fibrose comparé à ceux aux stades F0 et F1, tandis que les marqueurs des collagènes de type III, IV, et VI sont plus élevés chez ceux au stade F3 comparé aux patients aux stades F0-F2. Le collagène de type I n'est quand à lui pas altéré dans cette étude.

En ce qui concerne les métalloprotéases, l'expression des MMP2 et la MMP9 profibrotiques sont augmentées chez les patients chroniquement infectés par le VHC^{194,224,225}, tandis que les MMP1 et MMP13 fibrolytiques sont sous-régulées^{194,226}. Ces dernières étant des collagénases, leur sous-expression indique une amplification des dépôts de fibres de collagènes insolubles. Parallèlement, la TIMP1 voit son expression augmenter dans le cas d'une infection par le VHC pour tenter de compenser

l'accroissement de l'activité des MMP^{194,227}, et les taux d'expression de cet inhibiteur des MMP corrélerent avec le stade de fibrose des patients.

Plusieurs fragments circulants de collagènes, ainsi que la quantité de TIMP1 présente dans le plasma, ont été suggérés comme biomarqueurs de la fibrose hépatique liée à l'hépatite C chronique. Entre autres, le propeptide N-terminal du collagène de type III (Pro-C3 ou PIIINP) a spécifiquement été étudié à la fin des années 1990 / début des années 2000 comme biomarqueur pour la prédiction de la progression de la fibrose chez des patients chroniquement infectés par le VHC²²⁸, mais également chez des patients souffrant de fibroses hépatiques liées à une autre étiologie (alcool, maladies auto-immunes)²²⁹⁻²³². Ce fragment est particulièrement présent dans le sérum lors de lésions nécrotico-inflammatoires dans le foie. La sensibilité du dosage de ce fragment dans le sang pour diagnostiquer l'état du foie varie entre 58 et 95%. Toutefois l'apparition de méthodes physiques non-invasives telles que l'élastographie a mis fin à ces études. De façon intéressante, l'acide hyaluronique était également pressenti comme un excellent biomarqueur de l'évolution de la fibrose hépatique dans le sang des patients, avec une sensibilité variant de 79 à 86%. Une étude récente dans une cohorte égyptienne démontre que ce score ELF (enhanced liver fibrosis) basé sur les mesures précédemment citées (TIMP1, PIIINP et acide hyaluronique) est toujours robuste et d'actualité pour évaluer l'avancement de la fibrose chez des patients infectés par le VHC²³³.

Enfin, en ce qui concerne les glycosaminocanes, l'effet du virus VHC a très peu été étudié, bien que l'intérêt pour des protéoglycanes tels que le SDC1 et le GPC3 ait progressé ces dernières années, en particulier en lien avec la carcinogenèse hépatique et l'entrée virale. De nombreuses études ont été réalisées sur la glycosylation du complexe de surface viral E1/E2, puisqu'elle impacte très fortement la capacité des particules virales à se lier à leurs récepteurs, mais également la capacité de ces particules à échapper à la surveillance immunitaire. Dans la mesure où les particules virales sont sécrétées via le RE et l'appareil de Golgi, elles sont soumises à de nombreuses glycosylations à leur surface. La presque totalité des études sur le sujet portent sur des types de glycanes qui n'ont pas été abordés ici (N- et O-glycanes)²³⁴, mais elles soulignent cependant que le virus détourne la machinerie cellulaire pour ces modifications post-traductionnelles. Beaucoup de sucres étant communs aux N-glycanes, O-glycanes et GAG, on peut alors imaginer que les altérations dans l'une de ces voies ont des conséquences sur les autres. Ces altérations sont également retrouvées dans le sérum de patients infectés : une étude récente a mis en avant des différences en terme de glycanes circulants qui existent entre l'infection par le VHC et le virus de l'hépatite B²³⁵. Le glycome sérique résultant en majorité d'éléments détachés de la surface des cellules du tissu où il circule, on peut alors transposer une partie de ces observations directement aux cellules infectées. Finalement, rien n'est encore connu sur les mécanismes viro-induits qui mènent aux altérations décrites jusqu'à présent dans les cellules infectées.

Problématiques et intérêt de la thèse

Après les résultats obtenus lors de l'étude publiée en 2017 sur la sous-régulation du SDC1 dans les cellules infectées, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de cette sous-régulation. Nous sommes alors allés explorer la voie de biosynthèse du SDC1, et à plus large échelle des protéoglycanes, et avons tenté de répondre à plusieurs questions :

1. La sous-régulation du SDC1 est-elle le reflet d'altérations plus globales dans le glycocalyx des cellules infectées ?
2. La chaîne de biosynthèse de ces éléments est-elle impactée dans les cellules infectées, et si oui à quel(s) stade(s) et dans quelle(s) mesure(s) ? Cette chaîne faisant intervenir des enzymes, nous avons essayé d'adresser à la fois la question de l'expression et celle de l'activité quand cela était possible.
3. La quantité des substrats de cette chaîne de biosynthèse est-elle impactée par l'infection ?
4. Si tel est le cas, est-ce que d'autres voies cellulaires dans lesquelles interviennent ces substrats sont impactées ?

L'intérêt de cette étude dans le contexte actuel de l'hépatite C est de mieux comprendre les altérations cellulaires qui sont induites par ce virus fibrogène et oncogène. Les glycanes étant fortement impliqués dans la communication cellulaire, leur altération pourrait aboutir à une signalisation aberrante qui participerait à la pathogenèse virale. En 2018, l'hépatite C est une infection en fort déclin en France et dans bien d'autres pays développés, mais nous ne connaissons toujours pas bien les mécanismes de la progression de la maladie. De plus, chez certains patients, la clairance virale ne permet pas d'arrêter l'évolution de la fibrose ou la cirrhose. Il est donc essentiel, encore aujourd'hui, de mieux comprendre les effets de cette infection.

Matériel & Méthodes

Dosage du xylose

Les cellules ont été lysées en tampon CHAPS comme décrit précédemment. Les lysats ont ensuite été soniqués (Bioruptor[®] Plus - 10 cycles – 30s ON/15s OFF). Le réactif colorimétrique a été préparé comme décrit²³⁶, soit 100mL d'acide acétique glacial (VWR) mélangés avec 10mL d'acide chlorhydrique fumant (VWR) et 0,5g de phloroglucinol (Sigma ref 79330 HPLC grade). La réaction colorimétrique a été réalisée sur 50 μ L de lysat cellulaire mélangé avec 450 μ L de réactif acide, puis le mélange a été chauffé à 100°C pendant 4min pour déclencher la réaction colorimétrique. 200 μ L du mélange réactionnel ont ensuite été déposés en duplicat dans une plaque 96 puits (Falcon, fond plat) et la DO a été lue à 554nm. En parallèle une gamme de xylose en acide benzoïque saturé a été réalisée avec les concentrations suivantes : 0 ; 1 ; 2.5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 μ g/L.

Lyse cellulaire en tampon CHAPS

Les cellules ont été lysées dans le tampon suivant : 25mM Hepes 0,5M pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 1mM MgCl₂ ; 1% CHAPS. L'inhibiteur de protéase a été ajouté extemporanément (cOmplete[™] Protease Inhibitor Cocktail – Sigma) selon le protocole du fabricant. Brièvement, les cellules sont lavées au PBS 1X puis mises en contact avec le tampon de lyse pendant 10min. La récolte du lysat a été réalisée en grattant les puits avec un râteau (TPP), puis les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Western Blot

Les concentrations protéiques des lysats cellulaires ont été dosés avec le kit Pierce[™] BCA Protein Assay (ThermoFisher) selon le protocole du fabricant. 100 μ g de chaque lysat cellulaire ont ensuite été dénaturés et réduits 5min à 95°C en présence de tampon Laemmli contenant du β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été déposés dans un gel à 10% de polyacrylamide et ont migré environs 1h30 à 120V dans un tampon de migration Tris/Glycine/SDS dans le système d'électrophorèse mini-PROTEAN (Bio-Rad[®]). Les échantillons ont ensuite été transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Life Sciences) en tampon Tris/Glycine/20% éthanol en système Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad[®]) pendant 1h15 à 200mA. L'efficacité du transfert a été vérifiée en marquant les membranes au rouge Ponceau 5min à température ambiante, puis les membranes ont été saturées dans une solution de TBS-Tween 0.05%/lait 5% pendant 1h à température ambiante. Les marquages avec les différents anticorps primaires ont ensuite été réalisés dans la solution de saturation sur la nuit à 4°C. Les membranes ont ensuite été rincées 3 fois 5min en tampon TBS-T puis incubées avec les anticorps secondaires adéquats pendant 1h30 à température ambiante. Les membranes ont ensuite été rincées 3 fois 5min en tampon TBS-T, et le marquage a été révélé via une réaction de chimioluminescence

(Clarity™ Western ECL Bio-Rad®) selon le protocole du fabricant (BioRad™ Universal HoodII). Les images ont été analysées grâce aux logiciels Image Lab (acquisition) et ImageJ (densitométrie).

Culture cellulaire

Les cellules de la lignée d'hépatocarcinome Huh7.5 étaient un cadeau du Dr Rice (Rockefeller University, NY, USA), et ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco™) supplémenté en glutamine (1X GlutaMAX, Gibco™), pyruvate de sodium (1mM Sodium Pyruvate, Gibco™), antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, Gibco™) et sérum de veau fœtal (FBS heat inactivated One Shot™, Gibco™). La différenciation des cellules Huh7.5 a été faite en ensemençant les cellules sur collagène (collagen type I from rat tail, Corning), puis en supplémentant le milieu de culture avec 1% de DMSO lorsque les cellules étaient à 85-90% de confluence (Sigma). La différenciation a été réalisée sur environ 5 à 7 jours de culture selon les cellules (observation microscopique).

Infection

La préparation et la titration du virus HCV de souche JFH-1 (Japanese fulminant hepatitis 1) ont été réalisés comme précédemment décrit²³⁷. Le plasmide encodant le génome complet du virus JFH-1 (pJFH1) a été fourni par le Dr Wakita (Tokyo, Japon). Tous les procédés expérimentaux subséquents pour préparer les particules virales (HCVcc) ont précédemment été décrits²³⁸. L'infectivité du virus dans les surnageants a été évaluée par marquage des unités formatrices de foyers infectieux (FFU/mL) en ciblant la protéine core du virus.

Les infections sur cellules non différenciées ont toutes été réalisées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.1. Les infections sur cellules différenciées en DMSO ont été réalisées à une MOI de 0.05. Le virus a été laissé en contact avec les cellules pendant trois jours puis le milieu de culture a été changé. Dans la condition non-infectée (mock), les cellules sont laissées en contact avec du milieu de culture sans virus pendant trois jours, puis le milieu est changé en même temps que celui des cellules infectées.

Traitement au sofosbuvir après infection

Les cellules ont été infectées pendant 6 heures à une MOI de 0.1 le lendemain de leur ensemencement. Elles ont été passées 3 jours après l'infection, et traitées au sofosbuvir à 10µM le lendemain de leur passage (soit à 4 jours d'infection). Les points prélevés en terme d'infection ont donc les correspondances suivantes en terme de traitement au sofosbuvir : D5 (1 jour de traitement), D7 (3 jours de traitement), D8 (4 jours de traitement) et D11 (7 jours de traitement).

Dot blot

Les cellules ont été infectées selon le protocole décrit ci-dessus et les milieux ont été changés après 3 et 5 jours d'infection (D3 et D5) dans les conditions infectées et non-infectées (mock) pour renouveler les nutriments cellulaires. Les surnageants de culture cellulaires ont été inactivés thermiquement au P3 à

65°C pendant 5min selon le protocole préétabli²³⁹. Les cellules mortes ont ensuite été éliminées par centrifugation à 800g pendant 5min. Les surnageants ont ensuite été traités selon le protocole expérimentale établi par le Dr Vivès (IBS, Grenoble, France). Un tampon de blotting 5X 0.2M acétate de sodium pH 4.5/0.75M NaCl/0.5% Triton X100 a été préparé. Une membrane de nylon (Amersham Hybond N+, GE Healthcare Life Sciences) a été prééquilibrée dans une solution 1X de blotting buffer puis montée dans un système de dot blot (Minifold I system, GE Healthcare Life Sciences) selon le protocole du fabricant et rincée deux fois avec 250µL de la solution de blotting 1X. 200µL de surnageant ont été mélangés avec 50µL du tampon de blotting 5X extemporanément puis lentement déposés sur la membrane de nylon (2min de dépôt par échantillon environs). La membrane a ensuite été rincée deux fois avec 250µL de tampon de blotting 1X, et bloquée en TBS/5% lait/5% BSA pendant 2 heures à température ambiante. La membrane a été incubée sur la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire en TBS/0.05% Tween/5% BSA. Le marquage avec l'anticorps secondaire adéquat a été réalisé dans une solution de TBS/0.05% Tween/5% lait pendant une heure à température ambiante. La membrane a ensuite été rincée 3 fois 5 minutes en tampon TBS-Tween et le marquage a été révélé via une réaction de chimioluminescence (Clarity™ Western ECL Bio-Rad®) selon le protocole du fabricant (BioRad™ Universal HoodII). Les images ont été analysées grâce aux logiciels Image Lab (acquisition) et ImageJ (densitométrie).

Extraction ARN et qPCR

Les ARN totaux des cellules en culture ont été extraits en TRIzol® selon le protocole du fabricant. La quantité d'ARN a été dosée au NanoDrop™ (Ozyme), et 1µg d'ARN a été traité à la DNase (DNase I recombinant, RNase-free, Merck) selon le protocole du fabricant. Les échantillons ont ensuite été reverse transcrits (5X All-In-One RT MasterMix, Applied Biological Materials) selon le protocole du fabricant. Les ADN complémentaires ainsi obtenus ont été dilués au 1/5^e puis mélangés avec du SYBR green (SYBR® Green PCR Master Mix, Roche) et les amorces adéquates dans 10µL finaux. Les PCR quantitative ont été réalisées sur un système QuantStudio Flex (Applied Biosystems™) avec 40 cycles d'amplification à 60°C. Pour la détection de l'infection les amorces RC1 et RC21 précédemment décrites (Komurian-Pradel et al, 2001) ont été utilisées. Le gène de la β-glucuronidase (GUS) a été utilisé comme référence.

(Co)marquages immunofluorescents

Les cellules ont étéensemencées et infectées sur lamelles de verre puis fixées aux temps indiqués dans un mélange froid 50% méthanol/50% acétone pendant 30 minutes à -20°C. Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois en PBS froid puis stockées à 4°C jusqu'au marquage.

Les lamelles ont été fixées dans une solution de PBS/3% BSA pendant 30 minutes à température ambiante. Le marquage avec le premier anticorps primaire a été réalisé dans la solution de saturation

pendant 1h15 à température ambiante sous agitation douce. Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois 5 minutes avec 300µL de PBS/3% BSA/0.1% Tween, et incubées sous aluminium avec le premier anticorps secondaire adéquat dans la solution de saturation pendant 45 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été rincées 2 fois 5 minutes avec 300µL de PBS/3% BSA/0.1% Tween et 2 fois 5 minutes dans 300µL de PBS. Le marquage avec le deuxième anticorps primaire a été fait dans la solution de saturation sur la nuit à 4°C, puis les lamelles ont été rincées 3 fois 10 minutes dans la solution PBS/3% BSA/0.1% Tween. Le marquage avec le deuxième anticorps secondaire a été réalisé dans la solution de saturation pendant 45 minutes à température ambiante. Les noyaux ont ensuite été marqués au DAPI dans la solution de saturation pendant 5 minutes à température ambiante, et les lamelles ont été rincées 2 fois 5 minutes dans la solution PBS/3% BSA/0.1% Tween, puis 2 fois 5 minutes dans du PBS. Les lamelles ont ensuite été montées sur lame dans un milieu hydrophile (Fluorescence Mounting Medium, Dako) et conservées à 4°C jusqu'à observation. Les observations ont été faites sur un microscope confocal Spectral TCS SP5X (Leica), et les analyses ont été faites à l'aide du logiciel ImageJ.

Test d'activité enzymatique de la xylosyltransferase

Le test d'activité enzymatique de la XYLT2 a été réalisé en partenariat avec et selon le protocole de l'équipe du Pr Kuhn (HDZ NRW, Bad Oeynhausen, Allemagne) selon le protocole préétabli (Kuhn et al, BBRC 2015). Les cellules ont été rincées au PBS, puis détachées à la trypsine-EDTA (Gibco) pendant 5 minutes à 37°C, et enfin centrifugées à 1000g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été lavé deux fois au PBS/1% SVF et congelé rapidement dans de l'azote liquide. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 200µL de solution PBS/0.1% Tween et mélangées avec des billes de verres d'un diamètre compris entre 425 et 600µm. Les cellules ont ensuite subi des cycles de 2 minutes sur vortex suivi de 10 minutes d'incubation sur glace jusqu'à lyse complète (surveillée optiquement). Le mélange a ensuite été centrifugé à 1000g pendant 10 minutes et le lysat a été récupéré. 50µL de ce lysat a ensuite été mélangé avec 5µL de tampon MES (250mM pH 6.5), 5µL de solution Mg/Mn (250mM KF, 50mM MgCl₂/MnCl₂), 20µL de solution d'UDP-xylose (80µg/mL), et 20µL de peptide accepteur K1 (ca. 60µg/mL dans de l'eau, A₄₅₀ : 0.4). Toutes les solutions ont été préparées et généreusement fournies par l'équipe du Pr Kuhn. Le mix réactionnel a été incubé à 37°C pendant 90 minutes, et la réaction a été arrêtée à 99°C pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes et le surnageant a été transféré dans des tubes en verre à HPLC pour l'analyse en LC-MS/MS. Ces analyses ont été réalisées à Berlin dans les laboratoires de la société Chromicent GmbH par le Dr Claudia Martin.

Anticorps

Anticorps	WB	Dot blot	IF
SDC1 – DL101 (SCBT) – Ms	1/250 ^e	1/250 ^e	
SDC1 – H174 (SCBT) – Rb			1/200 ^e
SDC1 – BB4/BA38 (BioRad®) - Ms			1/200 ^e
SDC4 – 5G9 (SCBT) – Ms		1/250 ^e	1/200 ^e
SDC4 – ab24511 (Abcam) - Rb			1/200 ^e
UGDH – HPA036656 (Atlas) – Rb	1/100 ^e		
XYLT2 – ab155193 (Abcam) – Rb	1/500 ^e		
UXS1 – SAB2701450 (Sigma) – Rb	1/500 ^e		
αSMA – A2547 (Sigma) – Ms			1/200 ^e
Actine	1/1000 ^e		
Tubuline – PA1-20988 (ThermoFischer) – Rb	1/1000 ^e		1/200 ^e
HCV capsid – C7-50 (SCBT) – Ms	1/250 ^e		1/200 ^e
SRBI – EP1556Y (Abcam) – Rb			1/200 ^e
Integrine α3β1 – P1B5 (Abcam) – Ms			1/200 ^e
LDL-R – Ab-1 (Oncogene) – Ms			1/200 ^e
Occludine – MCA3308 (BioRad®)			1/200 ^e
CD81 – H121 (SCBT) – Rb			1/200 ^e
CD81 – 5A6 (SCBT) – Ms			1/200 ^e
E-cadherine – H108 (SCBT) – Rb			1/200 ^e
Alexa Fluor® 488 – Invitrogen – Ms			1/1000 ^e
Alexa Fluor® 488 – Invitrogen – Rb			1/1000 ^e
Alexa Fluor® 555 – Invitrogen – Ms			1/1000 ^e
Alexa Fluor® 555 – Invitrogen – Rb			1/1000 ^e
Alexa Fluor® 647 – Invitrogen – Ms			1/1000 ^e
Alexa Fluor® 647 – Invitrogen – Rb			1/1000 ^e

Amorces pour la qPCR

Gène	Forward	Reverse
UGDH	TGCTGGGAAGTGGTACAATCA	GTCCTGGCTCATAAATAGGAAGTG
UXS1	CAACCGCAGGAGGATGAAGC	CCTGGATAGACCTGTTGAGTAGAA
SLC35D1	TTCATGATTCTGCCACCCT	TCAGCCCAGCCTTCAAACCT
EXT1	CAAGCCCCTACCAGCCAAAC	GCGAAATCCACCTCTGTTGTTG
EXT2	CTCTCTAGGTGGGATCGAGGT	CTGACATCGTAGCCTTGCCG
NDST1	CTCAGTGCCTATCACGCCAA	GGATCAAACGCCAAGGTTTTGT
SDC1	GCTGACCTTCACACTCCCA	CAAAGGTGAAGTCCTGCTCCC
XYLT2	CGAGAAAGGAAGGCAGAGGAAG	TTACTGCCCGTACCACCTTG
GUS	CGTGGTTGGAGAGCTCATTTGGAA	ATTCGCCAGCACTCTCGTCGGT
HCV	GTCTAGCCATGGCGTTAGTA	CTCCCGGGGCACTCGCAAGC
NOTCH2	GGCACGTCAGGGGTTAATTG	CTTGCGACAGGGATTGGAGG
NOTCH3	CATCTGGTTGCTGCTGACAT	GCCTCATCCTCTTCAGTTGG
JAG1	GACTCATCAGCCGTGTCTCA	TGGGGAACACTCACACTCAA
SOX9	TACCCGCACTTGCACAACG	CGTTCTTCACCGACTTCCTCC
XXT1	TCTTCCTCTCGGTCGCCAT	GCCAGAATGTGTGCCTGTAAAC
GXT1	CGGACAGGTGTAAAGATTTCTCTC	TCCAGTCTTTCACCACAGGC
HES1	GAGAGGCGGCTAAGGTGTTT	GTGTAGACGGGGATGACAGG
HES4	CTCAGCTCAAACCCTCATCCT	CAGGTGTCTCACGGTCATCT

Biopsies

Les échantillons cliniques ont été utilisés selon l'accord du Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est IV, agrément n°11/040 obtenu en 2011. Les patients ont tous signés un consentement écrit.

Tests statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism7 (RITME). Les détails des tests réalisés ainsi que les effectifs sont indiqués dans les légendes des figures.

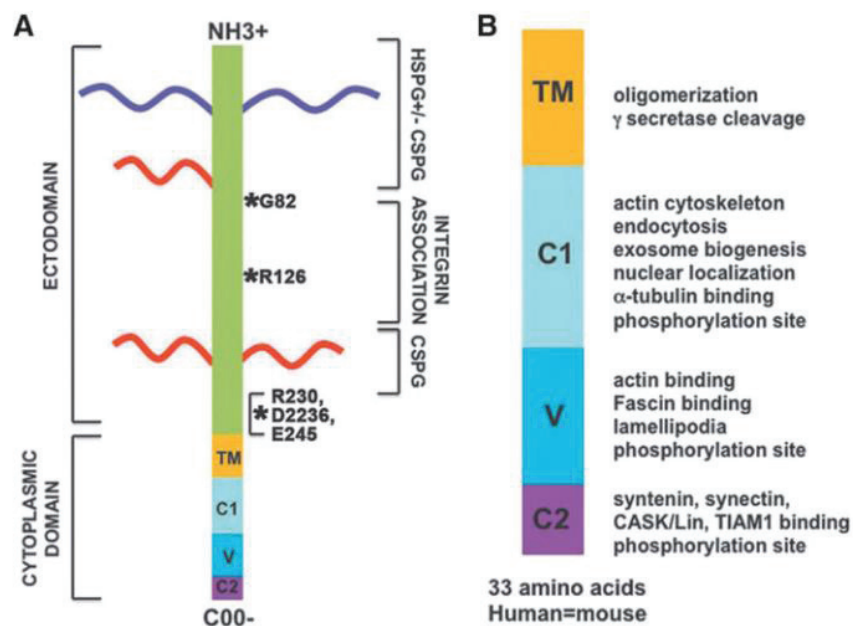
RESULTATS

Partie 1 : L'infection par le VHC induit une sous-expression du SDC1 *in vitro*

Article en 2^{ème} auteur : **Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx.** Grigorov, Reungoat et al. *Cellular Microbiology*, 2017.

Résumé des résultats principaux

Le virus de l'hépatite C infecte les hépatocytes après son attachement aux HSPG, en particulier le SDC1, suivi de sa reconnaissance par ses récepteurs dont la tétraspanine CD81. Nous avons étudié l'influence de l'infection sur le glycocalyx, en particulier sur l'expression du SDC1 et d'une enzyme-clef de sa biosynthèse, la XYLT2. Aux stades précoces de l'infection, les particules virales sont colocalisées en surface avec le SDC1 puis co-internalisées dans des endosomes. L'expression du SDC1 et de la XYLT2 (évaluée par Western blot et en qPCR) est altérée dans les jours suivant l'infection : celle du SDC1 diminue fortement, tandis que l'expression de la XYLT2 augmente. Ces résultats indiquent une restructuration profonde du glycocalyx de l'hépatocyte pendant l'infection par le VHC. Ceci pourrait participer à la mise en place d'un environnement cellulaire et matriciel favorable pour la persistance et la propagation de l'infection.



Structure du syndécan-1. (A) schématisation du protéoglycane entier. L'ectodomaine est présenté en vert et porte les chaînes HS (violet) et CS (rouge). Les étoiles indiquent les sites de clivage lors du shedding. (B) représentation détaillée du domaine transmembranaire (jaune) et cytoplasmique avec les fonctions associées à chaque région. C1&C2 : régions conservées, V : région variable entre syndécans. D'après Stepp et al, 2015²⁴⁰.

Partie 2 : Contributions non publiées

L'infection par le VHC *in vitro* se fait classiquement par un protocole de mise en contact simple des particules HCVcc avec des cellules de la lignée Huh7.5. Au bout de 6 jours d'infection, les cellules contrôles non-infectées sont à très forte confluence et nécessitent d'être trypsinées, tandis que les cellules infectées présentent un fort taux de mortalité. Quand les conditions expérimentales le permettaient, nous avons donc utilisé un deuxième protocole d'infection nécessitant de différencier les cellules Huh7.5 avant de les infecter. Ceci permet de garder les cellules infectées plus longtemps en culture (jusqu'à environ 14 jours) sans les passer (restauration de l'inhibition de contact), ce qui préserve également le glycocalyx formé à la surface de ces cellules. L'autre avantage de ce protocole est qu'il permet de se rapprocher davantage de ce qu'il se passe *in vivo* puisque la charge virale de départ est diminuée (MOI 0,05 au lieu de 0,1) et que l'infection prend plus de temps pour se mettre en place et se disséminer (observations faites par immunofluorescence pour révéler le VHC, données non montrées).

Altération des composants de surface du glycocalyx suite à l'infection par le VHC *in vitro*

L'infection par le VHC *in vitro* induit une augmentation du shedding du SDC1

Suite aux résultats obtenus dans notre étude publiée en 2017, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'étude de l'expression de surface du SDC1 dans les cellules infectées. Ce HSPG est soumis au phénomène de shedding. Nous avons évalué son expression de surface par une approche d'immunomarquage suivi d'une analyse en cytométrie de flux (figure 1A) ; la quantité d'ectodomains libérés dans le milieu de culture suite au shedding a été évaluée par dot blot. Cette technique consiste à faire passer du milieu de culture à travers une membrane de nylon dans un système de plaque 96 puits sans fond (« dot »), puis de révéler la quantité de SDC1 libre dans ce milieu par immunomarquage (« blot ») (figure 1B et 1C).

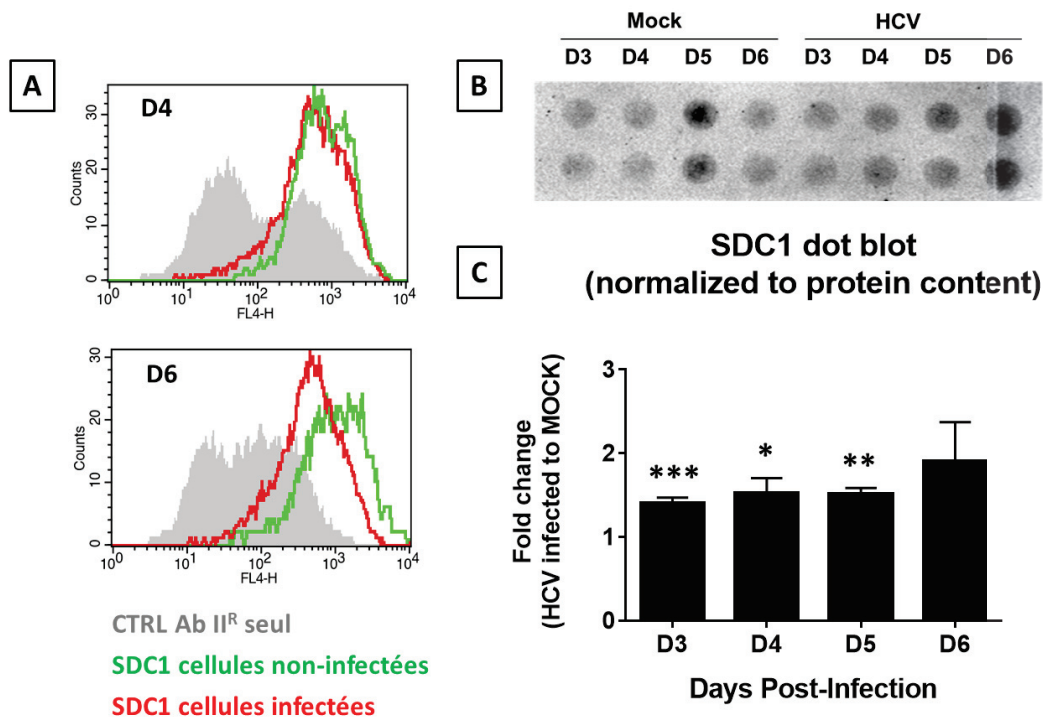


Figure 1 : A. Expression de surface du SDC1 évaluée par cytométrie en flux. La courbe grise correspond au marquage avec l'anticorps secondaire seul (contrôle), la courbe verte correspond au marquage sur cellules non-infectées, et la courbe rouge correspond au marquage sur cellules infectées depuis 4 (D4) ou 6 jours (D6). B et C. Marquage du SDC1 suite à un dot blot réalisé sur milieu de culture de cellules infectées entre 3 et 6 jours (D3 à D6). La quantification du signal a été faite par densitométrie et normalisée par rapport à la quantité de protéines totales dans le lysat cellulaire correspondant (N=3). Analyse statistique en one sample t-test comparant les moyennes de « fold change » à une valeur fixe de référence de 1.

La diminution de l'expression de surface du SDC1 corrèle avec l'augmentation de la quantité d'ectodomains libres dans le milieu de culture, indiquant que le shedding du SDC1 augmente avec l'infection.

Nous nous sommes tournés vers des technologies d'études plus globales pour évaluer les changements au sein du glycocalyx de façon générale. Pour cela, nous avons fait appel à l'aide d'équipes de recherche en France et à l'étranger spécialisées dans l'étude des PG et autres composants de cet environnement cellulaire.

L'infection par le VHC *in vitro* induit une modification des chaînes héparane sulfate (en collaboration)

Notre collaboration avec l'équipe des Drs Romain Vivès et Hugues Lortat-Jacob (IBS, Grenoble) nous a permis d'évaluer spécifiquement les variations quantitatives et qualitatives dans les héparanes sulfates.

Leur technique de chromatographie liquide en haute performance (HPLC) permet de différencier et quantifier les disaccharides composants les chaînes HS en fonction de leurs taux et types de sulfations.

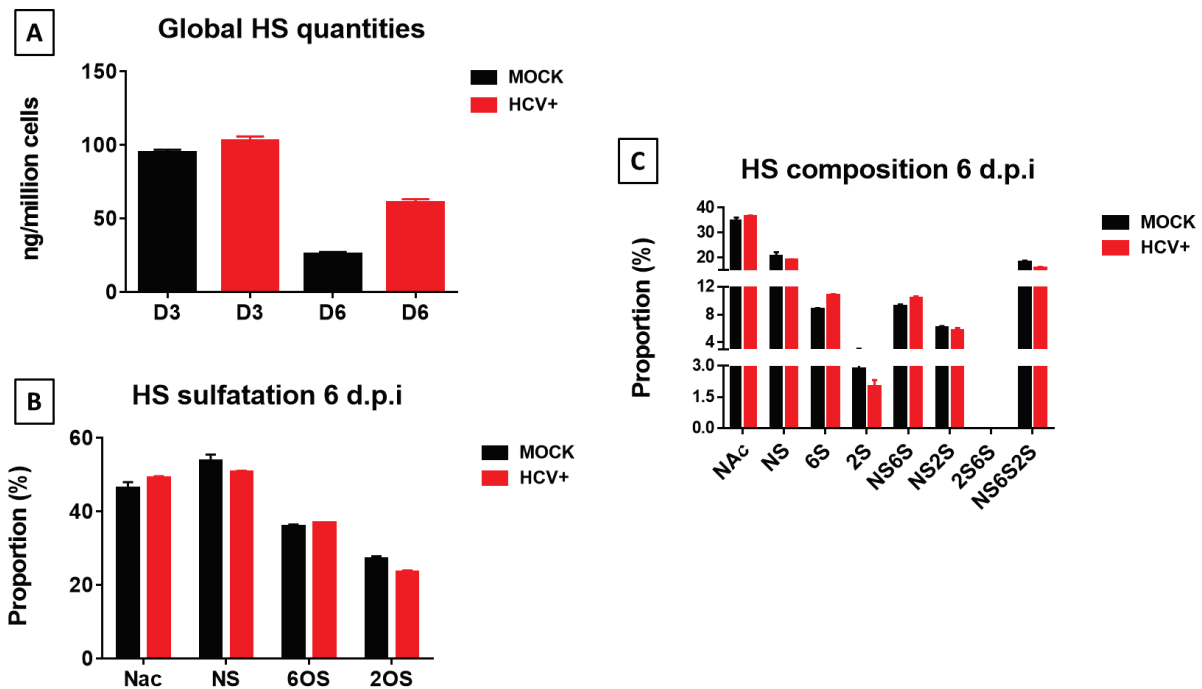


Figure 2 : Analyse des sucres composant les chaînes HS par HPLC. A. Quantification globale des disaccharides présents à la surface de cellules infectées (rouge) ou non (noir) pendant 3 (D3) et 6 jours (D6). La quantité de disaccharides est normalisée par rapport au nombre de cellules présentes dans la boîte de culture avant traitement à la trypsine. B. Proportionnalité des différents types de sulfation à la surface de cellules infectées et non-infectées. Nac : N-acétylé, NS : N-sulfaté, 6OS : 6-O-sulfaté, 2OS : 2-O-sulfaté. C. Quantification spécifique des disaccharides en fonction de leurs types de sulfation. 6S : 6-sulfaté, 2S : 2-sulfaté, NS6S : N-sulfaté puis 6-sulfaté, NS2S : N-sulfaté puis 2-sulfaté, 2S6S : 2-sulfaté puis 6-sulfaté, NS6S2S : N-sulfaté puis 6- et 2-sulfaté (N=1 en triplicats techniques).

Aucun changement n'est visible sur les chaînes HS à 3 jours post-infection. Après 6 jours, la quantité de sucres diminue fortement dans la condition contrôle, alors que ce n'est pas autant le cas dans la condition infectée. On observe une augmentation de 2 fois à la surface des cellules infectées par rapport aux contrôles (figure 2A). En ce qui concerne la répartition des types de sulfations (figure 2B), aucun changement n'est observable, ni à 3 jours ni à 6 jours post-infection. Enfin, si l'on quantifie spécifiquement chaque type de disaccharide présent à la surface des cellules (figure 2C), certains changements sont visibles 6 jours post-infection (les résultats à 3 jours ne sont pas inclus, ne montrant aucune variation). En effet, les espèces 6-sulfatées sont plus représentées à la surface des cellules infectées, tandis que les espèces 2-sulfatées diminuent. Ceci indique un changement de composition en sucres dans les chaînes HS à la surface des cellules infectées.

Une autre étude est en cours en collaboration avec l'équipe du Pr Papy-Garcia et du Dr Huynh à l'Université Paris Est Créteil pour étudier les altérations de surface à une échelle plus globale. En effet, par des techniques de digestion enzymatique de certaines chaînes de sucres, l'analyse de ces fragments en spectrométrie de masse et la coloration des GAG sulfatés au bleu de diméthyléthylène^{241,242}, cette équipe nous fournira des réponses concernant la quantité totale de GAG sulfatés présents en surface de nos cellules et le ratio entre chaînes CS et HS. L'analyse préliminaire de ces résultats très récents semble indiquer qu'il y aurait une augmentation de la quantité globale de GAG à la surface des cellules infectées après leur différenciation en DMSO. Les figures finales de ces expériences seront présentées le jour de la soutenance de thèse.

Altération de la biosynthèse des HSPG dans les cellules infectées par le VHC

L'infection par le VHC induit une altération de l'expression des enzymes de biosynthèse des HSPG

Suite à l'observation de ces modifications de surface dans le glycocalyx, nous nous sommes intéressés à l'expression des enzymes de biosynthèse de certains composants, en particulier ici les HSPG. Pour cela nous avons quantifié l'expression transcriptionnelle (RT-qPCR) des enzymes UGDH et UXS1, qui transforment respectivement l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique dans le cytoplasme et l'UDP-acide glucuronique en UDP-xylose dans le RE/appareil de Golgi, ainsi que l'expression du transporteur SLC35D1 capable de transférer l'UDP-acide glucuronique du cytoplasme vers la lumière du RE/Golgi. Ces expériences ont été réalisées sur des extraits d'ARN de cellules Huh7.5, différenciées ou non, et infectées ou non (figure 3), ainsi que sur des extraits d'ARN de biopsies de patients infectés ou non par le VHC et à différents stades de fibrose (F0 à F4) (figure 5).

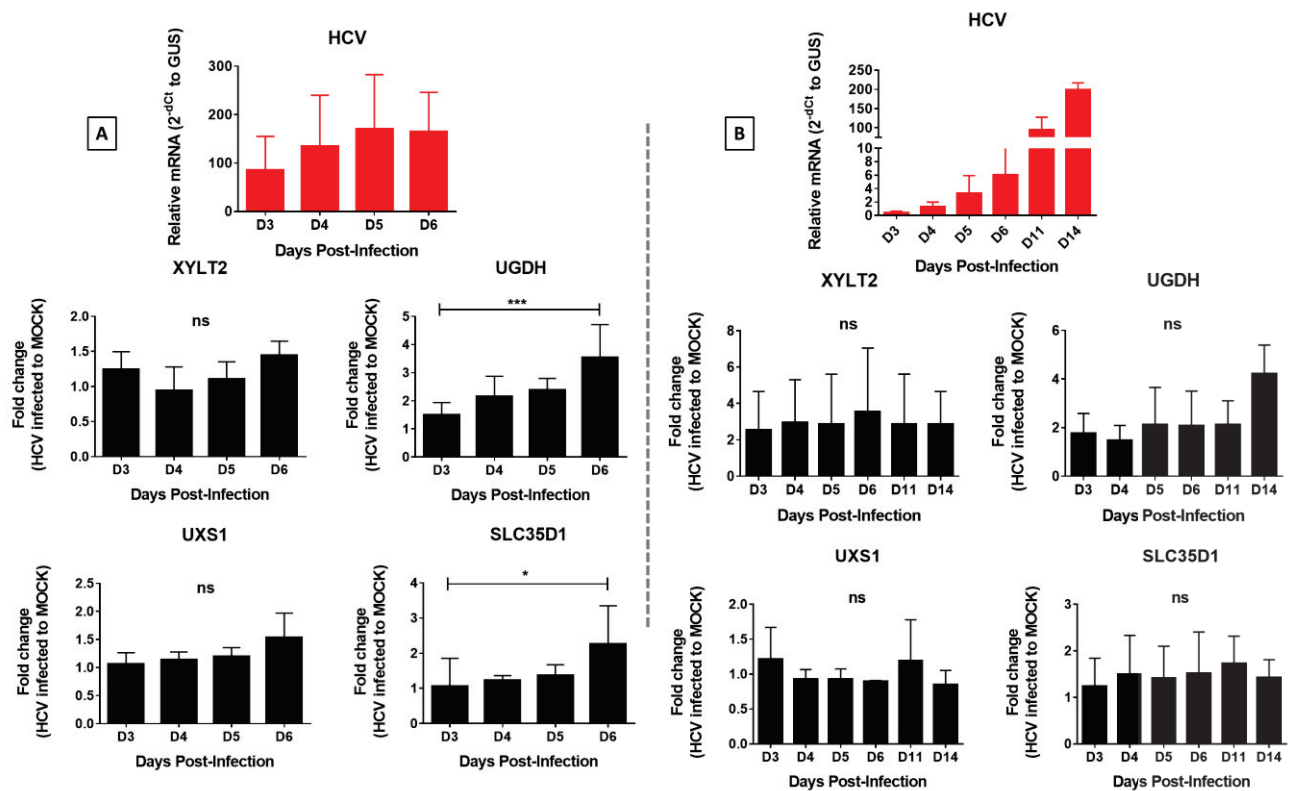


Figure 3 : Expression transcriptionnelle de facteurs de la voie de biosynthèse des HSPG in vitro. A. Cellules infectées classiquement de 3 (D3) à 6 jours (D6). B. Cellules différenciées en DMSO infectées de 3 à 14 jours. Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport aux cellules non infectées (mock)(N=3). Les tests statistiques reposent sur un test de comparaison de Tukey des valeurs exprimées en « fold change » afin de regarder la variabilité au cours du temps d'infection. Des tests statistiques de Student (avec une approximation de Mann-Whitney) pour comparer les valeurs entre condition non-infectée et infectée pour chaque jour ont également été réalisés (non montrés ici).

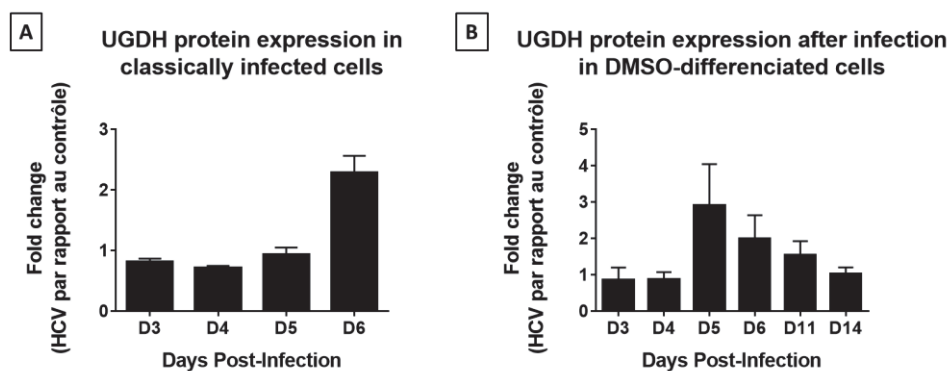


Figure 4 : Expression protéique de l'UGDH après infection. A. Analyse par Western blot dans des cellules infectées selon le protocole classique (N=2). B. Analyse par Western blot dans des cellules différenciées au DMSO puis infectées par le VHC (N=1). L'analyse des résultats a été faite par densitométrie du signal obtenu par Western blot après marquage de l'UGDH, et ce chiffre a été ramené

au signal obtenu après marquage de l'actine dans les mêmes puits. Expression finale des résultats en « fold change » dans la condition infectée par rapport à la condition contrôle.

Les résultats présentés dans les deux modèles d'infection ne peuvent évidemment pas être directement comparés puisque la physiologie des cellules est très probablement modifiée par la différenciation au DMSO, avec des répercussions sur l'expression basale des différents facteurs (ceci a été quantifié mais n'est pas montré ici). Cependant, il est possible de regarder si les variations d'expressions se retrouvent dans les deux conditions d'infection (valeurs en « fold change ») et si elles évoluent de la même façon au cours du temps (test statistique de Tukey présenté sur les graphiques). Il ne s'agit donc pas de faire des comparaisons jour à jour, mais bien de comparer des tendances d'expressions dans les deux conditions expérimentales parallèlement.

Dans les 2 modèles cellulaires, des augmentations d'expressions des gènes d'intérêt sont visibles (figure 3). La XYLT2 est faiblement surexprimée au niveau transcriptionnel dans les cellules classiquement infectées, et l'est plus fortement dans les cellules différenciées infectées (on observe une surexpression autour de 2-3 fois dans cette condition, et ce dès le 3^e jour post-infection). Ceci s'accompagne d'une très forte surexpression de l'UGDH dans les deux conditions d'infection, de plus de 3 fois dans la condition classique, et de plus de 4 fois dans la condition différenciée. Le test de Tukey permet également de mettre en évidence que cette surexpression augmente avec le temps dans la condition classique (figure 3A), tandis que cela n'est pas statistiquement significatif pour la condition différenciée (figure 3B). La surexpression transcriptionnelle de cette enzyme s'accompagne d'une surexpression protéique démontrée par Western blot (figure 4), bien que cette expérience nécessite d'être reproduite pour être pleinement analysée. L'enzyme UXS1 subit peu de modification d'expression dans les deux conditions d'infection. Enfin, le transporteur SLC35D1 est également surexprimé dans les cellules infectées classiquement (deux fois après 6 jours d'infection avec une augmentation d'expression au cours du temps). Cependant, cette surexpression est moins forte dans les cellules différenciées infectées, et on observe peu de variation au cours du temps. La quantification de l'expression protéique de ces deux derniers facteurs n'a malheureusement pas été possible par Western blot dans nos conditions d'expérimentation.

En ce qui concerne l'expression de ces facteurs dans des biopsies de patients, l'analyse peut être faite à deux niveaux. L'analyse de la moyenne des mesures faites tous groupes de fibrose confondus révèle une diminution de l'expression du SDC1 et de SLC35D1, ce qui signifie que l'infection par le VHC influe globalement sur ces protéines, quel que soit le stade de fibrose (Figure 5A). En stratifiant les résultats en fonction du stade de fibrose, on remarque que les variations les plus fortes pour toutes ces protéines sont observées majoritairement au stade F2, et au stade F3 mais de façon moins marquée. Ainsi, une sous-expression du SDC1, de l'UGDH et du transporteur SLC35D1 sont significativement observées de façon concomitante au stade F2, suivi d'une sous-expression de la XYLT2 au stade F3 (Figure 5B).

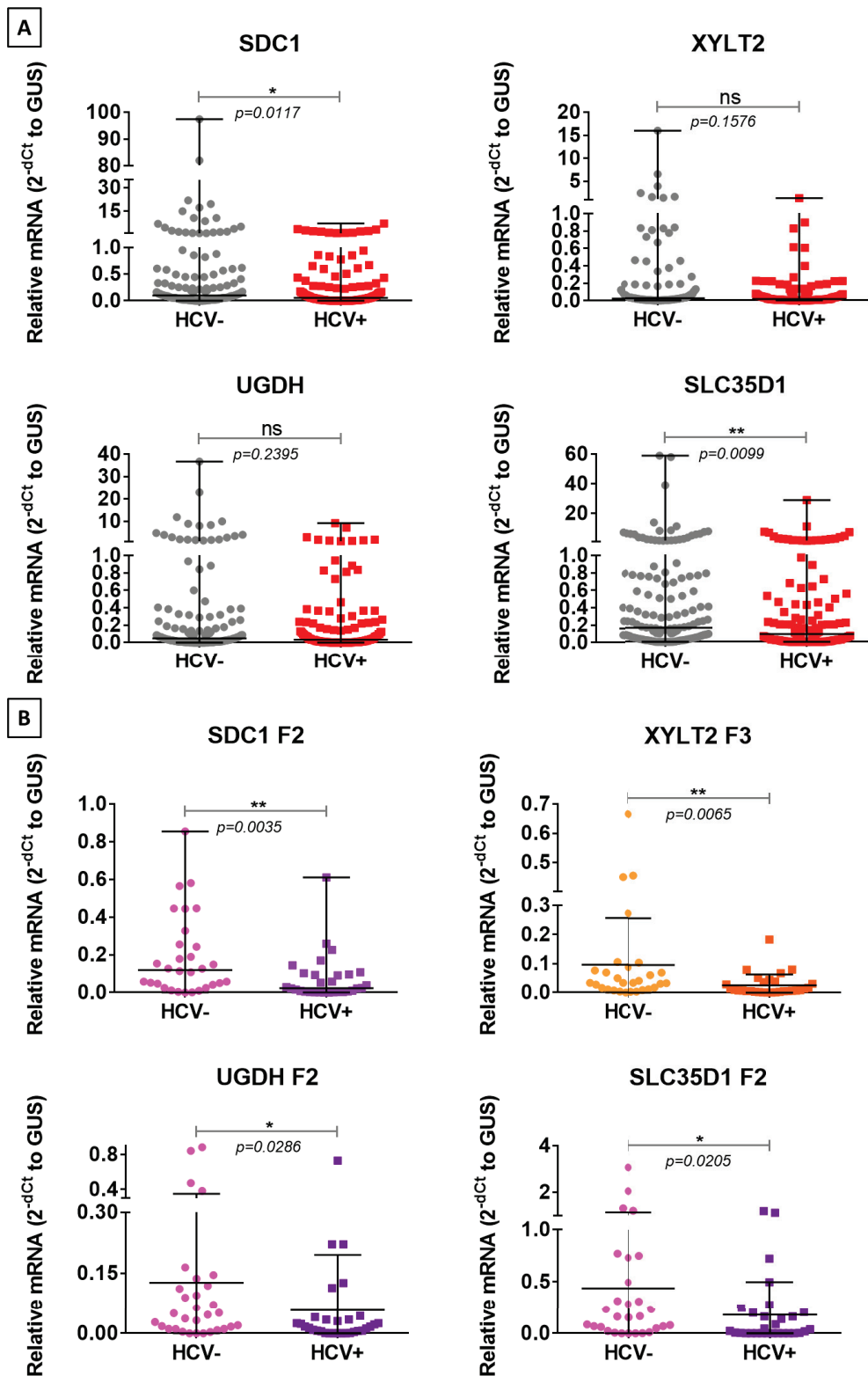


Figure 5 : Quantification de l'expression transcriptionnelle de facteurs et produit de la voie de biosynthèse des HSPG sur biopsies de patients à différents stades de fibrose hépatique. A. Moyenne globale des expressions en ARN dans tous les groupes de fibrose, comparaison en fonction du statut d'infection (n=149 non infectés, 122 infectés). B. Résultats spécifiques d'expression à certains stades

de fibrose, comparaison en fonction du statut d'infection (n=30 dans chaque groupe). Les analyses statistiques ont été réalisées par des tests de Student avec une approximation non-paramétrique de Mann-Whitney.

Afin de vérifier si les variations observées dans l'expression des facteurs de la voie de biosynthèse des HSPG sont bien reliées à l'infection, nous avons traité *in vitro* les cellules infectées avec un antiviral d'action directe de référence, le sofosbuvir. Nous avons réalisé des analyses en qPCR pour regarder si les niveaux d'expression de nos différents facteurs de la voie revenaient à la normale une fois l'infection éliminée (figure 6).

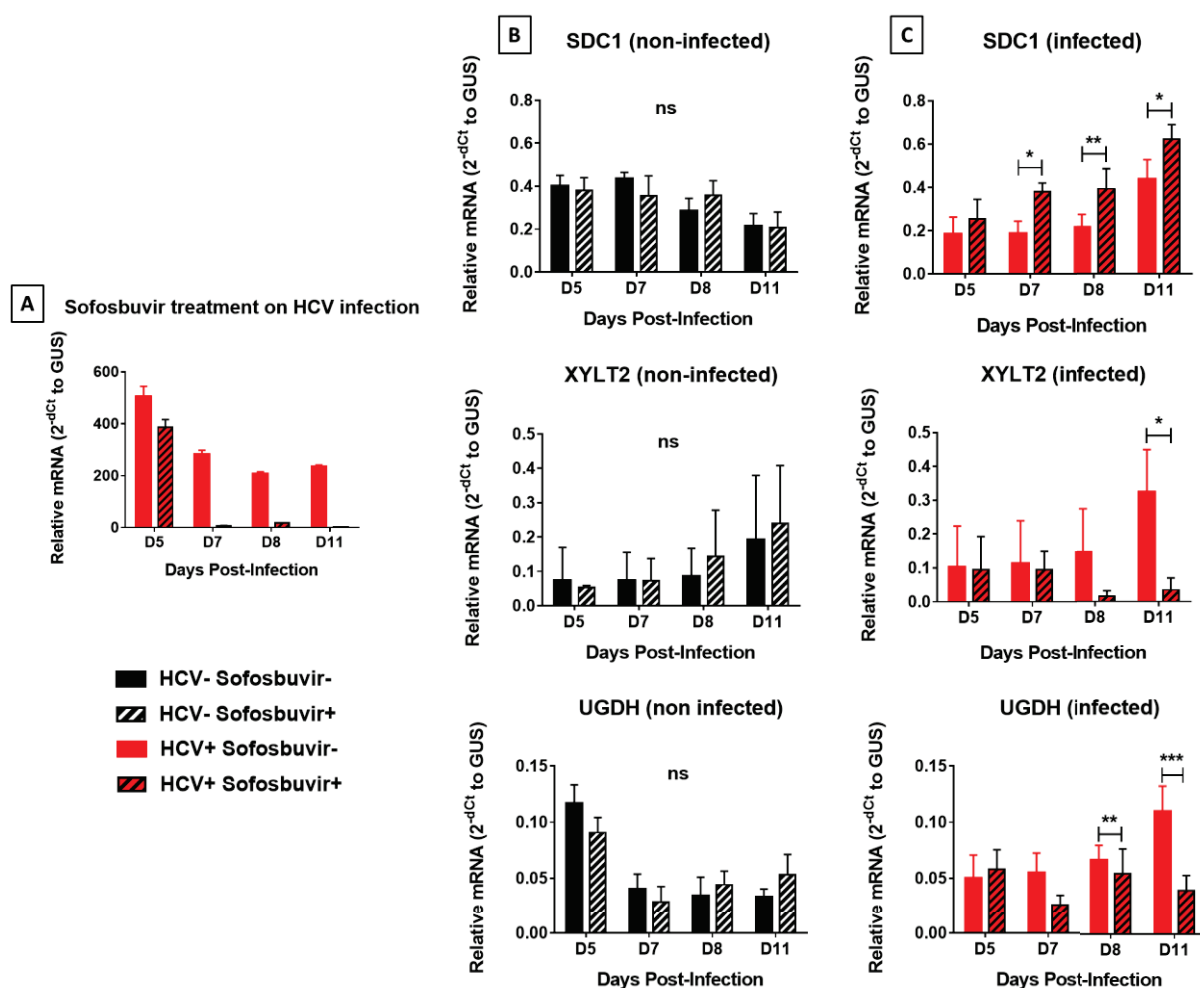


Figure 6 : Expérience de réversibilité du phénotype suite à l'élimination de l'infection. A. Contrôle de l'élimination de l'infection par qPCR sur l'ARN viral après traitement au sofosbuvir. B. Expressions transcriptionnelles de gènes de la voie des HSPG après traitement au sofosbuvir. C. Expressions transcriptionnelles des gènes de la voie des HSPG après infection avec ou sans traitement au sofosbuvir. Les analyses statistiques ont été réalisées par des tests de Student avec une approximation non-paramétrique de Mann-Whitney (N=3).

Dans cette expérience, nous observons dans un premier temps que le traitement au sofosbuvir permet bien d'éliminer l'infection, avec une diminution drastique de l'ARN viral dès 7 jours (figure 6A). Nous pouvons également voir que le traitement au sofosbuvir n'a pas d'effet sur l'expression des gènes d'intérêt, dans la condition sans virus (en noir, figure 6B). Enfin, la figure 4C montre que dans le cas des cellules infectées puis traitées par rapport aux cellules infectées sans traitement (en rouge), il y a une réversibilité du phénotype d'expression des gènes d'intérêt. En particulier, on peut observer que l'expression du SDC1 augmente avec le traitement au sofosbuvir, et que l'expression de la XYLT2 et de l'UGDH diminuent fortement, de manière statistiquement significative. Cette réversibilité du phénotype après traitement antiviral souligne donc bien que les variations d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des HSPG observés après infection par le VHC sont bien directement liées à l'infection virale.

Lors de l'infection par le VHC, le métabolisme des HSPG est perturbé, au niveau des facteurs de leur voie de biosynthèse. Cette perturbation est observée *in vitro* sur cellules Huh7.5, et *in vivo* sur biopsies de patients. Nous avons alors étudié l'activité d'une enzyme de cette voie, afin de savoir si celle-ci était également affectée par l'infection. Pour cela, nous avons fait appel à l'équipe du Pr Kuhn en Allemagne (Université de Bad Oeynhausen, Rhénanie du Nord-Westphalie), spécialisée dans l'étude des xylosyltransférases. Cette équipe a mis au point un protocole permettant de mesurer leur activité de façon indirecte en quantifiant son produit²⁴³.

Etude de l'activité de la xylosyltransférase-2 après infection par le VHC *in vitro* (en collaboration)

L'activité de la XYLT2 peut être mesurée après son extraction cellulaire et la mise en contact avec son substrat dans des conditions optimales de fonctionnement enzymatique. On ajoute également à ce mix réactionnel un peptide synthétique accepteur de xylose. La quantification du peptide ainsi xylosylé est alors possible par spectrométrie de masse, et reflète la capacité de l'enzyme à fonctionner. Nous avons réalisé cette expérience avec des extraits de cellules Huh7.5 infectées ou non par le VHC (Figure 5) et envoyé les produits chez nos collaborateurs en Allemagne.

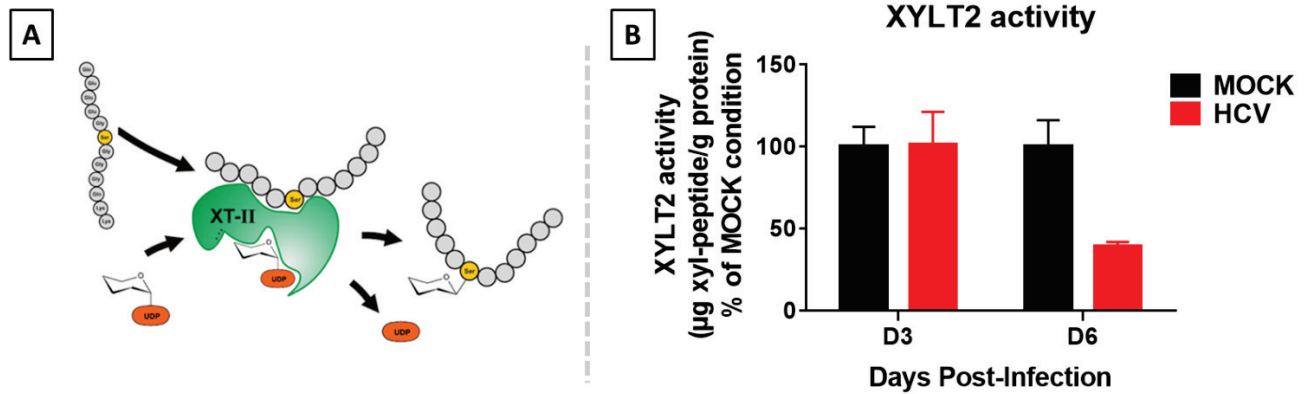


Figure 7 : Quantification de l'activité de la XYLT2. A. Conception expérimentale, selon Kuhn et al, 2015²⁴³. B. Activité de la XYLT2 dans des cellules Huh7.5 infectées depuis 3 (D3) ou 6 jours (D6). Les résultats obtenus dans les cellules infectées sont présentés en pourcentages de l'activité par rapport à la condition contrôle non-infectée (mock)(N=1 en triplicats biologiques).

On observe une diminution drastique de l'activité de la XYLT2 après 6 jours d'infection, de plus de 50%. Ainsi, l'altération de l'expression de la XYLT2 dans les cellules infectées classiquement s'accompagne d'une altération du fonctionnement de cette enzyme.

Dosage des sucres composants les chaînes GAG après infection par le VHC *in vitro* (en collaboration)

Nous nous sommes enfin intéressés au dernier composant de la réaction enzymatique des glycosyltransférases : le substrat. En effet, du fait des observations sur les enzymes de la voie de biosynthèse, nous nous sommes demandé si les teneurs en substrats de ces enzymes étaient également affectées par l'infection. Pour cela, nous avons utilisé deux approches expérimentales complémentaires.

En collaboration avec l'équipe du Pr. Lebrilla (University of California at Davis), nous avons partiellement répondu à cette question. Cette équipe a mis au point très récemment une technique d'HPLC à très haute résolution, couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC/MS), permettant de distinguer et quantifier différents sucres dans un mélange ou fluide biologique²⁴⁴. Ils ont donc analysé des extraits de cellules infectées ou non par le VHC, et dosé sous leur forme UDP l'acide glucuronique (GlcA), le galactose (Gal) et la N-acétylglucosamine (GlcNAc). Tous ces sucres sont utilisés dans la biosynthèse des chaînes HS, en particulier GlcA et GlcNAc formant le disaccharide de base de construction de ces chaînes.

Dosage de l'acide glucuronique, de la N-acétylglucosamine et du galactose

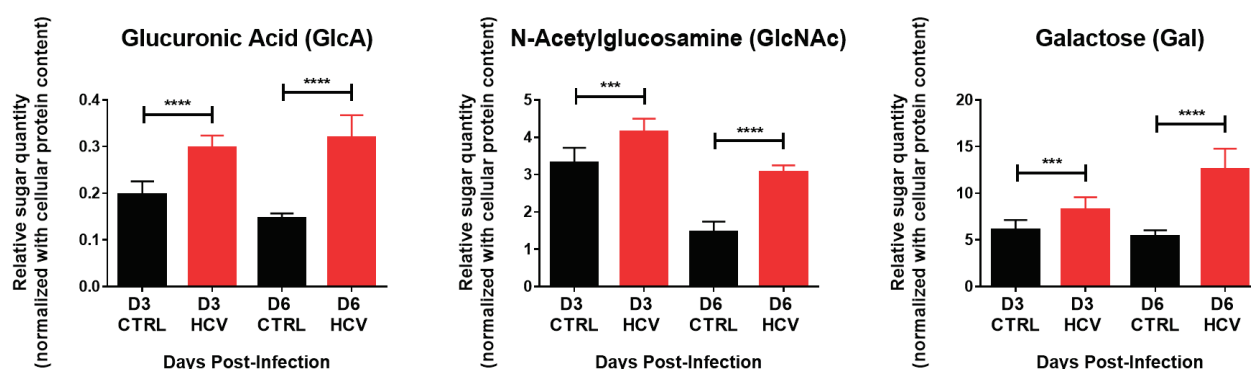


Figure 8 : Dosage des sucres *GlcA*, *GlcNAc* et *Gal* sous leur forme attachée à l'UDP par HPLC à très haute résolution, selon le protocole de Xu et al, 2017²⁴⁴. Les formes liées à l'UDP sont dosées grâce à une hydrolyse acide avant la chromatographie pour détacher le sucre du nucléotide. Aucun sucre sous forme libre sans UDP n'a parallèlement été détecté par cette méthode. Les résultats sont ici représentés sous forme normalisée avec la quantité de protéines présente dans le lysat cellulaire, afin de ramener les concentrations à la quantité de cellules effectivement lysées. Les concentrations absolues moyennes de ces différents sucres dans les lysats sont : entre 1 et 2 $\mu\text{g/mL}$ pour *GlcA*, entre 15 et 30 $\mu\text{g/mL}$ pour *GlcNAc*, et entre 40 et 100 $\mu\text{g/mL}$ pour *Gal*. L'analyse statistique est réalisée selon des tests de Student avec une approximation non-paramétrique de Mann-Whitney sur échantillons indépendants ($N=3$).

Pour ces trois sucres, on observe une forte augmentation de leur concentration intracellulaire dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles, et ce dès 3 jours d'infection.

Dosage du xylose : approche colorimétrique in vitro et sur échantillons de patients

Le xylose a été dosé par une approche colorimétrique selon un protocole de 1979²³⁶, adapté à nos conditions expérimentales. Des tests ont été réalisés pour contrôler la spécificité du dosage pour le xylose, en réalisant des gammes de glucose (hexose majoritaire dans les cellules) et de ribose (pentose majoritaire dans les cellules), dosées dans les mêmes conditions. La coloration obtenue avec le glucose (jaune orangé) est très différente de celle obtenue avec le xylose (rose fuschia) et ne perturbe donc pas la détection de la coloration, évaluée par spectrophotométrie à 554 nm (Figure 7A). Quant au ribose, il ne donne aucune coloration en fin de dosage (Figure 7B). Ce protocole semble donc être très spécifique du xylose. Des gammes très larges ont été réalisées pour contrôler la sensibilité du dosage. Une coloration est objectivable par mesure de la densité optique (DO) dès 1 $\mu\text{g/L}$ dans nos conditions, et tous les échantillons présentaient une concentration en xylose autour de 5 $\mu\text{g/L}$. Ainsi, ce test est robuste pour le dosage du xylose dans des échantillons cellulaires. A noter que ce test permet l'évaluation du xylose

provenant d'UDP-xylose, car une étape de minéralisation en acide chlorhydrique concentré et à chaud est réalisée au cours du dosage.

L'équipe du Pr Kuhn en Allemagne a d'ailleurs sollicité notre aide pour réaliser des dosages qui sont en cours de publication (cf Annexes). Afin de prendre en compte la mortalité cellulaire liée à l'infection, toutes les concentrations en xylose sont ramenées aux concentrations protéiques totales des échantillons (on calcule alors des μg de xylose par g de protéines).

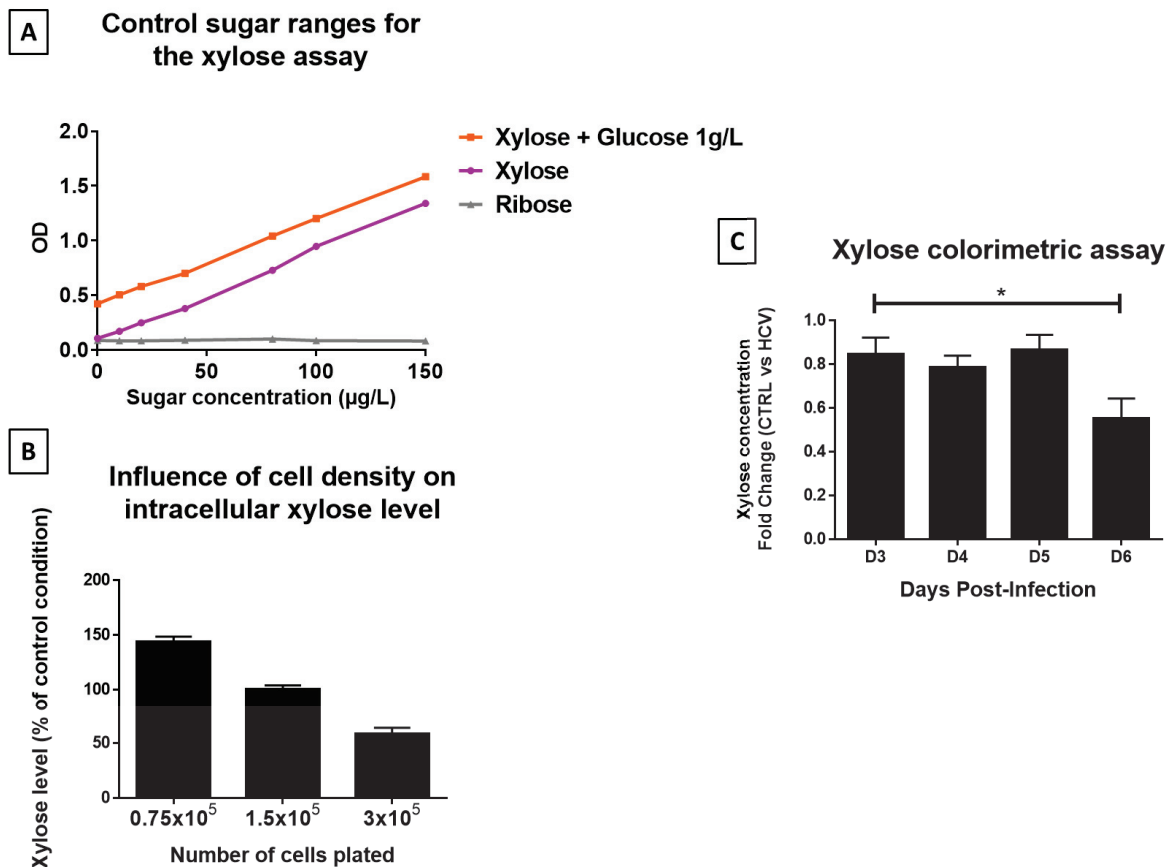


Figure 9 : Dosage colorimétrique du xylose après adaptation du protocole d'Eberts et al²³⁶. *A.* Contrôle de la spécificité du dosage pour le xylose. *B.* Contrôle de l'influence de la densité cellulaire sur la concentration intracellulaire en xylose. *C.* Dosage du xylose dans des extraits de cellules infectées ou non par le VHC entre 3 et 6 jours remplacer DOSAGE par ASSAY dans ton titre. L'analyse statistique est réalisée selon des tests de Student avec une approximation non-paramétrique de Mann-Whitney sur échantillons indépendants ($N=5$).

La concentration intracellulaire en (UDP-) xylose diminue dans les cellules infectées, et ce de façon significative 6 jours post-infection (Figure 7C). Ce dosage n'a malheureusement pas pu être réalisé avec des échantillons de cellules infectées différenciées, car le DMSO interfère avec la détection spectrophotométrique et fausse les résultats.

Nous avons ensuite réalisé ce dosage sur des échantillons de foie décellularisés de patients chroniquement infectés par le VHC, à différents stades de fibrose (Figure 8A). Ces échantillons nous ont été fournis par l'équipe des Dr Baiocchini, Tripodi et Mancone (Università La Sapienza, Rome, Italie), et correspondent au surnageant 2 de leur protocole²²². Ce surnageant renferme les contenus intracellulaires, obtenus à partir des biopsies hépatiques, et est l'équivalent *in vivo* des lysats intracellulaires *in vitro*, dosés pour leur contenu en xylose ci-dessus.

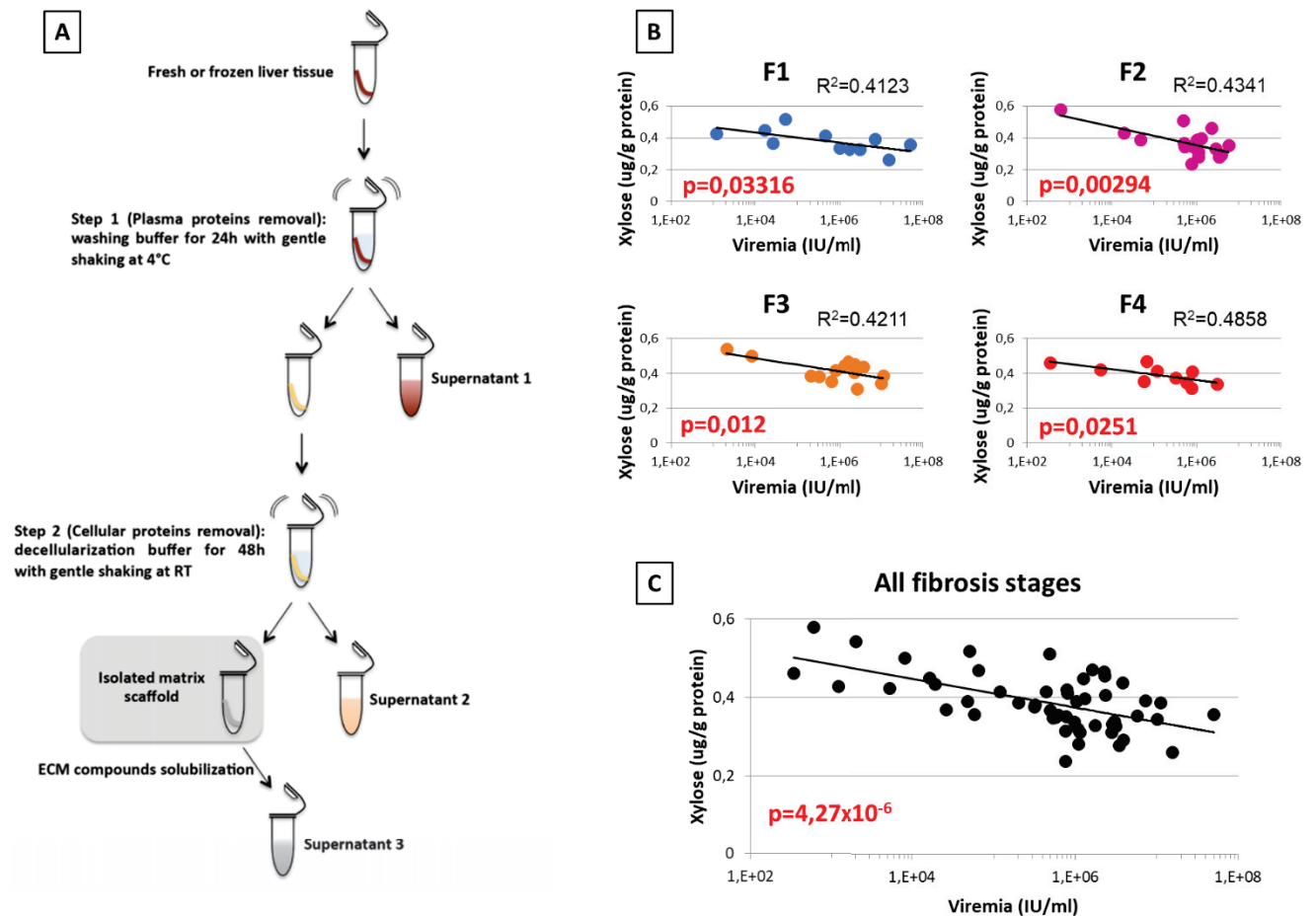


Figure 10 : Dosage colorimétrique du xylose dans des échantillons de patients infectés par le VHC.

A. Rappel schématique du protocole expérimental d'extraction du contenu intracellulaire du tissu hépatique prélevé, selon Baiocchini et al²²². Les extraits sur lesquels ce travail porte correspondent au surnageant 2 (en jaune). **B.** Corrélations entre concentration intracellulaire en xylose et virémie, présentées selon le stade de fibrose. **C.** Corrélation entre concentration intracellulaire en xylose et virémie, tous stades de fibrose confondus. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test d'égalité des variances de Fisher. (F1 : N=14, F2 : N=18, F3 : N=14, F4 : N=10).

Nous calculons qu'une très forte corrélation existe entre baisse du taux intratissulaire de xylose et virémie des patients (valeur $0,00294 \leq p \leq 0,03316$ en test de Fisher, selon le stade de fibrose) (Figure

8B) : plus la virémie est forte, plus la concentration en xylose est faible. Ceci est d'autant plus vrai pour les mesures tous stades de fibrose confondus ($p = 4,27 \times 10^{-6}$, Figure 8C). Aucun contrôle n'a pu être réalisé dans une condition sans virus car l'équipe d'Italie ne possède malheureusement aucun échantillon de patient non-infecté.

La voie Notch est affectée par l'infection par le VHC

En sus des HSPG/CSPG (chondroïtine sulfate PG), le xylose est utilisé dans une seule autre voie de biosynthèse, celle des protéines Notch. Il participe à l'inhibition de la voie de signalisation dans laquelle interviennent ces protéines, quand il est incorporé sur le cœur protéique sous l'action de glycosyltransférases spécifiques (voir partie introduction). Comme nous avons établi que les teneurs intracellulaires de xylose étaient altérées par l'infection, nous nous sommes donc demandé si la voie Notch était aussi impactée par l'infection. De précédentes études de transcriptomique ont exploré cette question en modèles de cellules infectées sur des temps courts, 48/72h^{245,246}. Nous avons exploré cela sur des temps d'infection longs, en utilisant nos deux modèles d'infection *in vitro* : classique (jusqu'à 6 jours d'infection) et après différenciation des cellules au DMSO (jusqu'à 14 jours d'infection).

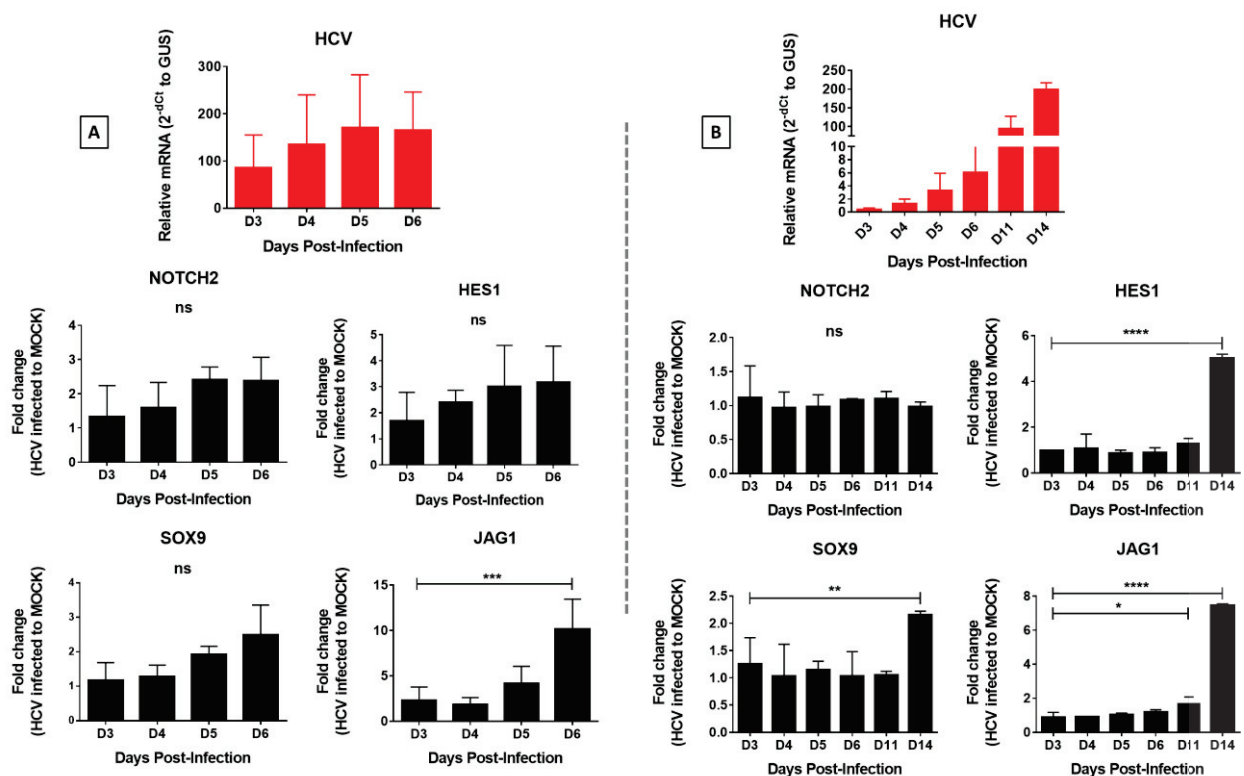


Figure 11 : Expression transcriptionnelle de facteurs de la voie Notch in vitro. A. Cellules infectées classiquement de 3 (D3) à 6 jours (D6). B. Cellules différenciées en DMSO infectées de 3 à 14 jours. Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport aux cellules non infectées (mock). Les tests statistiques reposent sur un test de comparaison de Tukey afin de regarder la variabilité au cours du temps d'infection (N=3). Des tests statistiques de Student (avec une approximation de Mann-Whitney)

pour comparer les valeurs entre condition non-infectée et infectée pour chaque jour ont également été réalisés (non montrés ici).

Dans les hépatocytes, le récepteur NOTCH2 est le plus fortement exprimé, nous l'avons donc sélectionné pour notre étude. Nous avons également suivi l'expression de JAG1, un des ligands des récepteurs NOTCH, ainsi que celles de SOX9, HES1 et HES4 qui sont trois facteurs de transcription dont l'expression est activée par la voie Notch. Suite à l'infection classique des cellules Huh7.5 par le VHC, on observe une très forte surexpression de tous ces gènes dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles. Cette surexpression est particulièrement forte pour le ligand JAG1 dont l'expression ARN augmente de presque 10 fois. On observe également que l'expression de HES1 et NOTCH2 augmente de façon très précoce suite à l'infection, puisqu'elle double après seulement 4 jours d'infection. Dans les cellules différenciées, la surexpression de NOTCH2 n'est pas véritablement visible, alors que les gènes HES1, SOX9 et JAG1 sont surexprimés (en particulier pour HES1, de 4 fois, et JAG1, de 7 fois). Il est possible que l'activation de la voie NOTCH passe par un autre récepteur dans les cellules différenciées au DMSO. Toutefois, l'activation de cette voie est retrouvée dans les deux conditions d'infection.

Il semblerait donc que l'altération des taux intracellulaires de xylose coïncide avec une altération massive de l'expression des protéines de la voie Notch, leurs ligand et facteurs-cible de transcription. Notre hypothèse selon laquelle une baisse des concentrations en xylose pourrait lever l'inhibition sur la voie Notch pourrait être une piste de recherche pour la suite du projet. Nous poursuivrons ces investigations *in vivo*, ainsi qu'en étudiant l'activité de la voie par un test fonctionnel.

DISCUSSION

Nos résultats pointent tous vers un remaniement massif du glycocalyx en surface des cellules infectées par le VHC. Ce remaniement est lié d'une part à une variation de l'expression de facteurs de la voie de biosynthèse, mais également au dysfonctionnement d'une glycotransférase essentielle, impliquée dans cette voie, dysfonctionnement corrélé à une privation de son substrat. De plus, ces altérations sont aussi bien observées *in vitro* qu'*in vivo* dans des échantillons de patients infectés.

Altération de l'expression de surface des glycanes

Tout d'abord, les glycanes exprimés à la surface des hépatocytes varient entre cellules infectées et non infectées. L'étude sur les héparanes sulfates réalisée en collaboration avec l'équipe de Grenoble indique une augmentation globale des disaccharides composant les HS à la surface des cellules infectées, et nos résultats préliminaires avec l'équipe de Paris semblent indiquer une augmentation de la quantité globale de GAG sulfatés. On peut avancer deux hypothèses : (i) soit il y a une augmentation globale du nombre de molécules d'HSPG, (ii) soit à quantités égales ou diminuées de chaînes protéiques, les chaînes de sucres sont plus longues. La question pourrait être tranchée s'il était possible de faire le séquençage en sucres des chaînes présentes sur ces PG. Nos collaborateurs ne possèdent cependant pas cette technologie, nous nous sommes donc tournés vers le xylose pour avoir un élément de réponse. En effet, le xylose étant le premier sucre attaché aux coeurs protéiques des HSPG, et parce qu'il ne se retrouve pas ailleurs dans ces chaînes, sa quantité dans les cellules refléterait le nombre de chaînes HS effectivement synthétisées. Nous avons observé une diminution de la quantité de xylose *in vitro* et *in vivo*, où la baisse de la teneur intracellulaire en xylose corrèle de façon statistiquement très significative avec l'augmentation de la virémie. Ceci fait pencher vers la 2^{ème} hypothèse, selon laquelle les chaînes HS sont plus longues sur les coeurs protéiques en surface des cellules infectées, ceci d'autant plus que nous avons démontré *in vitro* (Grigorov, Reungoat et al, Cell Microbiol 2017) et *in vivo* une diminution d'expression du HSPG syndécan-1. Une étude transcriptomique effectuée sur nos modèles d'infection *in vitro* est en cours d'analyse; nos analyses préliminaires révèlent aussi une sous-expression d'autres HSPG, comme le HSPG2, ainsi que de composants du glycocalyx interagissant directement avec les PG, comme la fibuline-1. Cette étude nous permettra d'estimer l'évolution des quantités des molécules d'intérêt au cours de l'infection.

L'étude en collaboration avec Grenoble indique également que les types de sulfation varient entre conditions contrôle et infectée. Or, la sulfation des chaînes de sucres est essentielle pour la reconnaissance et la fixation des facteurs avec lesquels elles interagissent. En effet, l'interaction ionique entre groupements carboxyls et sulfates des GAG et les acides aminés chargés positivement des protéines (principalement lysine et arginine) représente la principale contribution à la formation des

complexes GAG-protéines. Cette interaction peut contrôler la dégradation ou non du composant protéique, sa conformation, et son rapprochement avec son (co-) récepteur²⁴⁷. Si des variations ont lieu dans les types ou quantités de sulfation des chaînes HS, alors leur rôle vis-à-vis de leurs ligands est altéré. On peut par exemple citer le rôle des syndécans dans le rapprochement de la fibronectine de la MEC à ses récepteurs, les intégrines. Cette interaction entre syndécans et fibronectine constitue un des fondements de l'attachement cellulaire à la matrice, aussi il n'est pas surprenant que l'expression des syndécans soit affectée dans de nombreux cancers à fort pouvoir métastatique²⁴⁸⁻²⁵². Nos résultats sur biopsies de patients à divers stades de fibrose ont également révélé une sous-expression du syndecan-1 chez les patients infectés par le VHC.

Enfin, nos résultats concernant le shedding du SDC1 indiquent que ce phénomène cellulaire est également altéré dans les cellules infectées, et contribue probablement à l'altération de la communication cellule-cellule au sein de l'organe infecté. Il serait intéressant de réaliser une étude permettant d'identifier et quantifier les facteurs protéiques piégés dans les chaînes de sucres sulfatés à la surface de cellules infectées par le VHC, en comparaison avec des cellules saines. Ceci a été discuté avec nos collègues de l'IBS à Grenoble, mais nous n'en avons malheureusement pas eu le temps. Ces observations structurales pourraient alors être corrélées à des observations fonctionnelles en lien avec les altérations que nous observons.

Altérations dans la voie de biosynthèse des HSPG

En ce qui concerne la variation d'expression et d'activité d'enzymes et facteurs de la voie de biosynthèse des HSPG, de nombreuses questions restent ouvertes. Nous avons montré notamment la surexpression de la XYLT2, ainsi que la baisse de son activité *in vitro*. Dans la mesure où l'attachement du xylose est absolument essentiel pour l'expression des HSPG à la surface des cellules (sans quoi le corps protéique part en dégradation), et qu'aucune autre enzyme cellulaire ne peut compléter cette fonction, il n'est pas surprenant de constater la surexpression de l'enzyme, par compensation. Cependant, nous ne savons pas d'où provient la baisse d'activité de la XYLT2 dans les cellules infectées. Le virus se répliquant dans les compartiments membranaires intracellulaires où a lieu la biosynthèse des HSPG, et où donc se trouve la XYLT2, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : (a) l'infection induit un stress du RE/Golgi qui affecte indirectement le fonctionnement de l'enzyme, possiblement en modifiant sa conformation ; (b) une protéine virale proche de la XYLT2 interagit avec cette enzyme et inhibe son fonctionnement, en particulier si l'interaction a lieu dans une zone proche de la poche catalytique ; (c) un autre composé cellulaire interagit anormalement avec l'enzyme sous l'effet de l'infection, ce qui modifie sa localisation et/ou sa conformation. Il a précédemment été démontré que l'infection par le VHC induit un stress du RE des cellules infectées. En effet, la production de protéines virales en fortes quantités dans les réseaux membranaires créés par l'infection modifie la fluidité des membranes, et encombre le réticulum et l'appareil de Golgi. Ces compartiments cellulaires n'étant plus capables de

mener à bien le repli conformationnel des protéines néo-synthétisées, une réponse de type UPR (Unfolded Protein Response) est mise en place. Cette réponse conduit à une plus haute tolérance envers des protéines mal conformées dans le RE, et à l'activation de l'autophagie, deux processus favorisant l'infection²⁵³. Elle induit également un stress exprimé sous forme de libération excessive de calcium vers les mitochondries, induisant alors un stress oxydant et la production subséquente d'espèces réactives de l'oxygène²⁵⁴. On peut alors envisager que les facteurs de la voie de biosynthèse des HSPG soient également touchés par le stress oxydant, et ne puissent plus fonctionner convenablement.

Il serait intéressant de mener des expériences de co-immunoprécipitation ou de PLA (proximity ligation assay) dans des systèmes de cellules Huh7.5 infectées avec le virus répliquatif ou transfectées pour n'exprimer qu'une protéine virale, afin de rechercher une interaction possible entre protéine virale et XYLT2. L'étude de l'expression de cette enzyme dans notre cohorte de patients ne donne cependant pas les mêmes résultats, puisque son expression ne change globalement pas, tous stades de fibrose confondus. Il semblerait qu'une sous-expression existe au stade F3 de fibrose hépatique. Nous avons cherché des moyens de réaliser des tests d'activité enzymatique à partir de biopsies de foies de patients, mais cela aurait nécessité de récolter beaucoup de nouvelles biopsies conservées différemment de celles disponibles au laboratoire, et aurait évalué l'activité de la XYLT2 dans tous les types cellulaires du foie. Cette idée a donc pour le moment été mise de côté, bien que cette information soit importante pour comprendre ce qu'il se passe *in vivo*.

En ce qui concerne l'UGDH, sa surexpression observée en système d'infection *in vitro* corrèle avec une augmentation de son produit, l'acide glucuronique GlcA, dans le même modèle d'infection. Cet acide glucuronique étant utilisé dans l'élongation des chaînes HS, ce résultat vient soutenir notre hypothèse selon laquelle les chaînes synthétisées dans les cellules infectées seraient plus longues que dans les cellules contrôles. De plus, le xylose exerçant une inhibition sur l'activité/l'expression de l'UGDH, on peut alors penser que la concentration en xylose baissant dans les cellules infectées, cette inhibition est levée dans une certaine mesure. Nous sommes toutefois surpris par le résultat obtenu dans les biopsies de patients qui démontre globalement que l'expression de cette enzyme ne change pas, sauf à certains stades de fibrose uniquement où il décroît (stade F2). Nous ne savons pour le moment pas comment interpréter ce résultat, si ce n'est de dire que l'expression de l'UGDH semble être altérée chez les patients chroniquement infectés.

Les altérations d'expression de la XYLT2, de l'UGDH et même du SDC1 peuvent être réversées *in vitro* si l'on traite les cellules infectées avec un AAD, le sofosbuvir, qui abolit l'infection. Ceci démontre bien que les altérations d'expression que nous observons sont directement liées à l'infection par le VHC, et ne sont pas le produit de perturbations secondaires qui persisteraient une fois l'infection résolue.

Enfin, en ce qui concerne le transporteur SLC35D1, la tendance est la même que pour l'UGDH. On observe une surexpression de l'enzyme après infection *in vitro*, et une sous-expression dans les biopsies

de patients. Ici encore, il semble que les mécanismes cellulaires et viraux en modèles de laboratoire sont différentes de ce qu'il se passe chez un patient, et souligne surtout la différence fondamentale entre temps d'infection *in vitro* et survenue de la maladie hépatique / stades de fibrose *in vivo*.

Ces observations peuvent être reliées à des études antérieures sur l'altération de glycanes suite à l'infection par le VHC. Ces études portaient principalement sur deux aspects : d'une part les glycanes présents à la surface des particules virales, qui sont aussi le reflet des glycanes exposés à la surface des cellules infectées puisque l'enveloppe du VHC est dérivée des composants membranaires cellulaires, et d'autre part les glycanes que l'on retrouve dans la circulation des patients chroniquement infectés.

En ce qui concerne l'enveloppe virale, les glycanes qui y sont attachés sont principalement liés aux hétérodimères de protéines d'entrée E1/E2. On considère que les N-glycanes représentent un tiers de la masse de ces dimères, et jouent plusieurs rôles dans la réplication et la propagation virale. Tout d'abord, ces glycanes contrôlent le repliement des protéines virales E1 et E2 de par leur polarité, et également grâce à leur capacité à interagir avec certaines chaperonnes du réticulum endoplasmique²³⁴. Ensuite, ces glycanes influencent l'attachement des particules virales à leurs récepteurs, en particulier la tétraspanine CD81. Enfin, la présence de ces carbohydrates à la surface du virus lui permet en partie d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte en masquant les sites antigéniques qui pourraient être reconnus par des anticorps neutralisants. Aucune étude n'a encore été réalisée concernant la présence de protéoglycanes à la surface des particules virales. Pourtant, la présence de telles molécules sur les particules virales ne serait pas aberrante et pourrait également contribuer à assurer la propagation du virus. Quoiqu'il en soit, il a été démontré que le VHC était capable de moduler les glycanes présents à sa surface, ce qui contribue à l'adaptation du virus au cours du temps de l'infection²³⁴. Ceci n'est possible qu'en modulant la voie de biosynthèse de ces glycanes.

En ce qui concerne les glycanes dosés dans le sérum des patients infectés, une étude récente repose également sur la quantification de N-glycanes chez des patients infectés par le VHC ou le VHB par lecture de puces à lectines capables de capturer les sucres présents dans le sérum, combinée à l'analyse en spectrométrie de masse²³⁵. Cette étude a pour but d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour distinguer les patients infectés par ces virus. Les résultats font état de glycanes différenciellement exprimés chez les patients VHB uniquement, les patients VHC uniquement ou les deux cohortes comparées aux patients sains. Par exemple, les patients chroniquement infectés par le VHB présentent des glycanes circulants avec plus de branchements contenant une quantité accrue d'un sucre particulier, le fucose. Au contraire, les patients infectés par le VHC ont des glycanes circulants comportant plus d'acide sialique en plus d'une augmentation de la quantité de fucose. Une augmentation de la présence de mannose dans les chaînes est observée dans les deux cohortes de patients. Dans la mesure où les altérations du glycome sérique sont le résultat d'altérations à la surface des cellules du tissu dans lequel le sérum circule, on peut alors imaginer que ces modifications sont également présentes à la surface des

cellules du foie infecté par le VHC. Ces altérations ne peuvent aussi provenir que de changements viro-induits dans les chaînes de biosynthèses de ces glycanes, dont toutes font intervenir des glycotransférases au fonctionnement proche de celui de la XYLT2. Il a d'ailleurs été observé que l'activité de la XYLT2 présente dans le sérum de patients chroniquement infectés par le VHC augmentait avec la progression de la fibrose²⁵⁵. Toutefois, cette activité diminue chez les patients cirrhotiques. Nos résultats indiquent que dans les cellules infectées *in vitro* par le VHC, l'activité de la XYLT2 diminue. Il est difficile d'estimer à quel stade de l'infection physiologique correspondent les jours post-infection sur une lignée cellulaire. Toutefois, des altérations dans l'activité de la XYLT2 sont observées *in vitro* et *in vivo*.

Le schéma récapitulatif suivant résume les principales observations faites pendant ce travail de thèse.

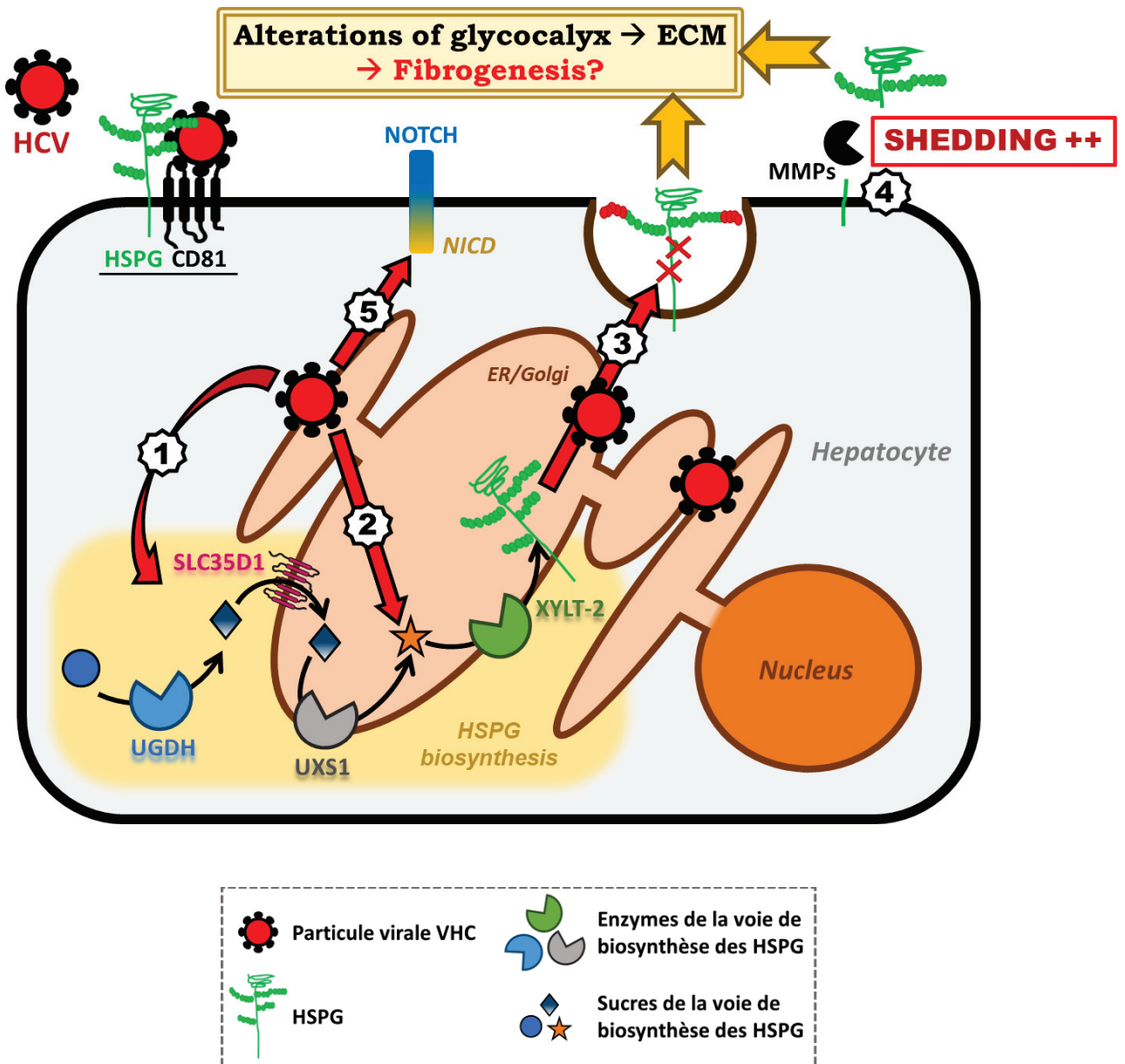


Schéma récapitulatif : L'infection par le VHC induit des altérations dans le glycocalyx des cellules infectées, ce qui participe à la fibrogenèse précoce. Après son entrée dans les hépatocytes faisant intervenir le duo SDC1/CD81, le virus poursuit son cycle vers le RE de la cellule infectée. Ceci mène à (1) des altérations de l'expression et l'activité de différents facteurs de la voie de biosynthèse de protéoglycane, (2) des variations de concentrations de sucres produits et utilisés dans cette voie, (3) un fort remaniement dans la nature et la quantité des composants du glycocalyx exprimés à la surface des cellules infectées. (4) Ces observations corréleraient également avec des altérations dans le shedding qui a lieu en surface, en particulier celui du SDC1. Enfin, l'infection virale mène également à (5) une activation de la voie Notch qui contrôle la destinée cellulaire, dépendante du shedding de son récepteur. Ces altérations contribuent probablement à la fibrogenèse viro-induite.

Intérêt de l'étude dans le contexte actuel et ouvertures

Vaccination anti-hépatite C

Dans le contexte de l'hépatite C, la glycosylation a surtout été étudiée en ce qui concerne les protéines de surface de la particule virale. Ces dernières années, un regain d'intérêt peut être observé en ce qui concerne les glycanes de la particule virale comme cible vaccinale.

Depuis la mise sur le marché des thérapies antivirales à base d'AAD contre le VHC, l'idée selon laquelle cette infection appartient désormais au passé circule. Or, le traitement est extrêmement coûteux, et bien que les négociations évoluent pour que des pays moins riches y aient accès, ce n'est pas encore le cas de la majorité des patients. De plus, l'absence de symptômes liés à cette infection pendant de nombreuses années dans la majorité des cas favorise sa propagation. La stratégie la plus efficace et la moins coûteuse pour se débarrasser définitivement d'une infection est classiquement la vaccination.

Actuellement, aucun vaccin n'est disponible contre l'hépatite C, et ce malgré des recherches intensives depuis sa découverte en 1989. Ces recherches se heurtent à différents obstacles viraux dont (i) l'hypervariabilité des protéines virales liées à une gigantesque diversité génétique, même au sein d'un seul individu où des quasi-espèces existent, et (ii) la permissivité très basse du virus pour d'autres espèces animales, rendant donc difficile l'expérimentation animale de vaccins candidats. Il y a donc une nécessité établie pour le développement de vaccins à multi-épitopes, dont l'étude de l'efficacité ne peut se faire que chez le chimpanzé²⁵⁶. Les stratégies actuelles de développement de vaccin dont entre autres l'utilisation de protéines d'enveloppe recombinantes, l'utilisation de peptides synthétiques couplés à des adjuvants, la construction de particules « virus-like » à partir de squelettes d'adénovirus par exemple, ou encore les vaccins à ADN.

Le potentiel des carbohydrates comme base vaccinale intéresse de plus en plus la communauté scientifique, en particulier les équipes travaillant sur l'hépatite C. Cette stratégie concerne aussi bien des infections virales que bactériennes, et est particulièrement intéressante pour plusieurs raisons. D'une part, les séquences de sucres que portent les glycanes ne sont pas déterminées par des séquences génétiques. Elles sont donc moins sensibles aux variations génétiques induites par les mutations. D'autre part, et comme souligné précédemment, les glycanes présents en surface des particules virales participent largement à la reconnaissance et l'attachement à la cellule-cible. Plusieurs vaccins ciblant des glycanes existent sur le marché ou sont en cours de développement²⁵⁷. Le vaccin PRP-T Hiberix (Merck) contre la bactérie *Haemophilus influenzae type b* (Hib) à l'origine de méningites et de pneumonies a reçu sa licence en 1985, et est dirigé contre un composant de la capsule bactérienne. Le vaccin contre le pneumocoque *Streptococcus pneumoniae* Prevan (Pfizer) immunise contre 13 polysaccharides de la bactérie. Jusqu'à présent, aucun vaccin antiviral dirigé contre des glycanes n'a été commercialisé, mais plusieurs sont en cours de développement. C'est le cas de vaccins contre le VIH

par exemple, dont les glycanes de l'enveloppe représentent une cible bien connue pour des anticorps neutralisants à large spectre (broadly neutralizing antibodies, bnAb). Ces anticorps sont efficaces contre un grand nombre de souches virales circulantes et leur efficacité a été démontrée chez des macaques. En ce qui concerne le VHC, dont les protéines d'enveloppe portent entre 6 et 11 N-glycanes pour E1 et E2 respectivement, plusieurs bnAbs ont été isolés *in vitro*. Trois d'entre eux ont été produits grâce à un système de particule recombinante adeno-associated virus (AAV) chez des souris à foie humanisé. L'intérêt des vaccins prenant pour cible des glycanes a également été éveillé dans les communautés travaillant sur la Dengue et le virus Lassa. Toutefois, l'immunogénicité des glycanes est très limitée puisque l'interaction entre ces glycanes et les anticorps est relativement faible. De plus, la réponse immunitaire tend à être courte et moins robuste qu'avec une cible protéique. Il est donc important de coupler les cibles sucrées à des protéines à fort pouvoir immunogène, telles que les toxines tétanique ou diphtérique.

La présence de protéoglycanes à la surface des particules virales en général, et sur les particules VHC en particulier, n'a jamais été démontrée. Or, puisque l'enveloppe virale est dérivée des membranes cellulaires portant des PG, il est raisonnable de penser que c'est très probablement le cas. Ces PG pourraient constituer des cibles antivirales à leur tour, peut-être même plus intéressantes que les N-glycanes seuls puisque les PG sont composés de sucres mais aussi d'un corps protéique qui pourrait avoir un pouvoir immunogène plus puissant. Notre étude interviendrait alors comme élément de réponse sur la nature et la synthèse des PG portés par les particules virales dérivées de cellules infectées.

Transformation cellulaire et oncogénèse virale précoce

Les études sur les conséquences de l'infection par le VHC sur la matrice extracellulaire, en particulier en ce qui concerne les hépatocytes, sont très peu nombreuses. Or, la compréhension des mécanismes menant à la fibrose hépatique viro-induite permettrait de mieux appréhender l'évolution de la maladie et de mieux la prendre en charge. D'un point de vue purement fondamental, il est également très intéressant de comprendre les perturbations induites par ce virus oncogène pour lequel, à ce jour, aucune hypothèse n'a été validée pour expliquer l'induction de la transformation cellulaire.

Le VHC ne comporte pas d'étape de sa réplication affectant directement le matériel génétique de la cellule infectée. De ce fait, il est supposé depuis longtemps que les mécanismes qui mènent à la transformation cellulaire sont indirectement liés à l'infection, comme par exemple l'établissement d'une inflammation chronique²⁵⁸. Cependant aucun modèle cellulaire actuellement disponible ne permet de répondre directement à cette question, puisque la seule lignée disponible est issue d'un hépatocarcinome et que l'infection ne peut y être maintenue plus d'une quinzaine de jours. Globalement, la communauté scientifique évoque l'empreinte laissée par l'infection dans les foies infectés, même après clairance virale^{258,259}. Ce « field effect » fait référence au milieu fibrotique ou cirrhotique hépatique favorisant l'apparition et la propagation de clones cellulaires néoplasiques. Les traitements antiviraux n'ont pas

d'effet sur ce phénomène, passé un certain stade d'évolution de la maladie, expliquant donc que des patients qui ont été guéris de leur infection au VHC continuent de développer un carcinome hépatocellulaire.

La protéine core du VHC est pressentie depuis longtemps comme facteur viral inducteur de cancer. En effet, cette protéine est fortement associée à la dérégulation du métabolisme lipidique ainsi qu'à celle du fonctionnement mitochondrial, participant de fait à l'établissement de la stéatose hépatique chez les patients infectés. Cette stéatose est très souvent associée au CHC induit par le VHC. Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de la protéine core induit une sous-régulation d'un facteur activateur de la sénescence hépatocytaire, rendant donc les cellules moins sensibles aux signaux d'apoptose qui font suite aux nombreuses divisions des hépatocytes dans un environnement malade pour tenter de régénérer l'organe²⁵⁹. Enfin, la protéine core semble agir directement sur plusieurs voies de signalisation cellulaire pour promouvoir le développement du CHC, en particulier en induisant la sous-expression de gènes suppresseurs de tumeurs (tels que p53 et la protéine du rétinoblastome pRB)²⁶⁰. Il est à noter que la protéine core est présente dans le noyau cellulaire, ce qui peut expliquer les effets décrits ci-dessus.

Dans notre étude, nous avons démontré que l'infection par le VHC *in vitro* induit l'activation de la voie Notch dans les cellules infectées, et ce regardant un plus grand nombre de facteurs de la voie et sur des temps plus longs d'infection que ce qui avait été précédemment décrit. Une étude de 2011 a identifié que la protéine virale non-structurale NS3 serait à l'origine de cette activation, d'une façon toutefois indépendante de son activité protéase²⁴⁶. Cependant cette étude repose sur un modèle de transduction de l'expression de cette protéine dans un modèle cellulaire très éloigné de l'hépatocyte (lignée HEK dérivée de cellules rénales embryonnaires). Nous faisons ici la démonstration de cette activation dans une lignée hépatocytaire. Il serait donc intéressant de mener des études similaires de surexpression de certaines protéines virales telles que core pour identifier celle(s) responsable(s) de cette activation de la voie Notch.

Parallèlement, l'intérêt de l'étude de cette voie nous est venu par les points qu'elle partage avec la biosynthèse et la régulation des HSPG. En effet, le xylose est un sucre qui, une fois attaché aux protéines Notch, inhibe l'activation de la voie. De plus, l'activation de la voie Notch dépend du shedding de son ectodomaine par des métalloprotéases telles qu'ADAM17, qui se trouve être aussi responsable du shedding du syndécan. Il serait alors intéressant de regarder si les perturbations que nous observons dans la voie des HSPG et dans la voie Notch sont liées d'une façon ou d'une autre par un même facteur viral par exemple, ou si elles sont partiellement le résultat de perturbations intervenant sur un facteur commun de ces voies. On peut alors envisager de réaliser des expériences de complémentation en xylose sur cellules infectées pour voir si le phénotype sur ces voies est réversible, ou tenter d'étudier l'activité de la protéase ADAM17 par exemple. Nous avons tenté une expérience de complémentation en xylose sur cellules infectées, mais une difficulté majeure existe dans cette approche : le xylose est faiblement

transporté depuis l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme par des transporteurs de glucose qui sont déjà saturés par le glucose du milieu de culture (5g/L), et par ailleurs le transporteur responsable du transport du xylose vers la lumière du RE/Golgi n'est pas exprimé dans la lignée Huh7.5. Enfin, il serait possible d'étudier l'activité des glycotransférases responsables de l'attachement des deux xyloses successifs sur les récepteurs Notch grâce à une technologie développée par une équipe allemande avec qui nous avons déjà échangé^{83,261,262}. Si les résultats allaient dans le même sens que ce que nous observons pour la XYLT2, alors un lien entre voie Notch et voie des HSPG pourrait peut-être voir le jour. Nous n'avons malheureusement pas pu aller plus loin dans cette étude pour le moment.

Les altérations que nous observons sur cette voie Notch qui contrôle la destinée cellulaire pourraient participer à la carcinogenèse précoce induite par le VHC. Il en va de même pour les altérations que nous observons sur les glycanes exprimés en surface des hépatocytes infectés : si les domaines de fixation de facteurs de signalisation circulant dans la matrice sont modifiés, alors toute la communication cellule-cellule peut être profondément perturbée. Or, le phénotype des cellules dépend fondamentalement des signaux reçus depuis l'extérieur, en particulier des signaux de différenciation, de migration ou encore d'apoptose. Il est donc tout à fait possible que ces altérations jouent également un rôle dans la transformation cellulaire induite par le VHC.

Conclusion

L'évolution de l'hépatite C chronique vers la fibrose, la cirrhose puis à terme le CHC est un phénomène qui s'étale sur 20 à 40 ans. On considère que 1 à 8% des patients chroniquement infectés par le VHC vont développer un CHC. Sur 3 à 4 millions de nouveaux cas d'infection par an, ces chiffres peuvent représenter jusqu'à 280 000 patients. Sur 150 millions de personnes actuellement infectées par le virus, ce chiffre monte à 12 millions de patients, soit la population d'une ville comme Bombay. La mise sur le marché au début des années 2010 des AAD permet effectivement de rétablir un état normal du foie chez les patients en état de fibrose modérée, mais une fois le stade de la cirrhose passé, cette réversion est bien plus difficile à obtenir. Ce sont donc plusieurs centaines de milliers de patients qui sont encore fortement exposés aux complications de cette infection.

Or, les mécanismes de la pathogenèse virale sont encore mal connus, et donc difficiles à cibler thérapeutiquement. Cette étude s'inscrit dans la volonté qui persiste dans la communauté scientifique de comprendre les mécanismes viraux de progression de la maladie afin de mieux la soigner à des stades plus avancés, et même de pouvoir un jour la prévenir grâce à une approche vaccinale.

Liste des publications

Publiée et disponible sur Pubmed :

- **Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx.** Grigorov B, Reungoat E, Gentil Dit Maurin A, Varbanov M, Blaising J, Michelet M, Manuel R, Parent R, Bartosch B, Zoulim F, Ruggiero F, Pécheur EI. *Cellular Microbiology* 2017

En cours de révision :

- **Molecular cross-talk between the hepatitis C virus and the connective tissue in liver fibrogenesis.** Emma Reungoat, Raffaella Romeo, Arnolfo Petruzzello, Fabien Zoulim, Eve-Isabelle Pécheur. *Biochemical Journal, review* 2018

En cours de soumission : articles en coauthorat & collaborations

- **TGF- β 1 independent xylosyltransferase-induction after an UDP induced repression of the extracellular matrix in normal human dermal fibroblasts.** Bastian Fischer, Thanh-Diep Ly, Doris Hendig, Joachim Kuhn, Eve-Isabelle Pécheur, Emma Reungoat, Cornelius Knabbe, Isabel Faust. *Experimental Cell Research* 2018
- **Innovative standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM.** Angelina Provost, Arnaud Favier, Marie-Thérèse Charreyre, Emma Reungoat, Nicolas Béard, Eve-Isabelle Pécheur, Catherine Ladavière, Christophe Place, Karine Monier. *Nature Methods* 2018

RESEARCH ARTICLE

Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx

Boyan Grigorov¹ | Emma Reungoat¹ | Alice Gentil dit Maurin² | Mihayl Varbanov³ | Julie Blaising¹ | Maud Michelet¹ | Rachel Manuel⁴ | Romain Parent¹ | Birke Bartosch¹ | Fabien Zoulim¹ | Florence Ruggiero⁴ | Eve-Isabelle Pécheur¹

¹CRCL, Inserm U1052, CNRS 5286, Université Lyon 1, France

²CEA-iRTSV - LBGE - Gen&Chem, U1038 INSERM/CEA/UJF, CEA-Grenoble, France

³UMR7565, Université de Lorraine, CNRS, Nancy, France

⁴IGFL, ENS Lyon, CNRS UMR 5242, Université Lyon 1, France

Correspondence

Eve-Isabelle Pécheur, CRCL, Inserm U1052/ CNRS 5286, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France.
Email: eve-isabelle.pecheur@inserm.fr

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) infects hepatocytes after binding to heparan sulfate proteoglycans, in particular Syndecan-1, followed by recognition of the tetraspanin CD81 and other receptors. Heparan sulfate proteoglycans are found in a specific microenvironment coating the hepatocyte surface called the glycocalyx and are receptors for extracellular matrix proteins, cytokines, growth factors, lipoproteins, and infectious agents. We investigated the mutual influence of HCV infection on the glycocalyx and revealed new links between Syndecan-1 and CD81. Hepatocyte infection by HCV was inhibited after knocking down Syndecan-1 or Xylosyltransferase 2, a key enzyme of Syndecan-1 biosynthesis. Simultaneous knockdown of Syndecan-1 and CD81 strongly inhibited infection, suggesting their cooperative action. At early infection stages, Syndecan-1 and virions colocalized at the plasma membrane and were internalized in endosomes. Direct interactions between Syndecan-1 and CD81 were revealed in primary and transformed hepatocytes by immunoprecipitation and proximity ligation assays. Expression of Syndecan-1 and Xylosyltransferase 2 was altered within days post-infection, and the remaining Syndecan-1 pool colocalized poorly with CD81. The data indicate a profound reshuffling of the hepatocyte glycocalyx during HCV infection, possibly required for establishing optimal conditions of viral propagation.

KEYWORDS

glycocalyx, heparan sulfate proteoglycan, hepatitis C, hepatocyte, tetraspanin

1 | INTRODUCTION

Proteoglycans are expressed in a tissue-specific manner as components of the surface cell environment, also known as the glycocalyx, and exert various functions. In particular, heparan sulfate

proteoglycans (HSPGs) comprise membrane-bound and secreted proteins complexed to a polydisperse mixture of polysaccharides, the heparan sulfate (HS) glycosaminoglycans. Liver HSPG harbor HS chains of unique structure, with almost twice the degree of *N*-sulfation, observed in other tissues (Toida et al., 1997). HSPGs also include components of the basement membrane such as perlecan, glypicans, and the transmembrane Syndecans (Synd) and CD44E (Esko & Lindahl, 2001). The Synd family comprises four members with similar structural features: (a) a large ectodomain exposed to the extracellular matrix, harboring HS chains and chondroitin sulfate chains; (b) a hydrophobic transmembrane segment; and (c) a short cytosolic tail involved in intracellular signalling. HSPGs, notably Synd-1 and Synd-4, contribute to infection by viruses such as hepatitis viruses B, C, delta, and E (Lamas Longarela et al., 2013; Lefèvre, Felmlee, Parnot, Baumert, & Schuster,

Emma Reungoat, Alice Gentil dit Maurin, and Mihayl Varbanov equally contributed to this study.

Abbreviations: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix; FFU, focus forming units; GFP, green fluorescent protein; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-grown HCV; HS, heparan sulfate; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; IF, immunofluorescence; JFH-1, Japanese Fulminant Hepatitis-1 HCV strain; MOI, multiplicity of infection; PBS, Phosphate-buffered saline; PHHs, primary human hepatocytes; PLA, Proximity Ligation Assay; SRBI, scavenger receptor BI; Synd, Syndecan; WB, western blot; Xylt, Xylosyltransferase.

2014; Schulze, Gripon, & Urban, 2007; Shi, Jiang, & Luo, 2013). Hepatitis C virus (HCV) is a strictly human pathogen acquired by contact with contaminated blood. It exhibits liver tropism, replicates in hepatocytes, and is a major cause of hepatocellular carcinoma. HCV encounters a specific microenvironment in the vicinity of the hepatocyte membrane, where Synd-1 and Synd-4 are found, and enters cells via a complex recognition process involving at least a quartet of receptors including the tetraspanin CD81 (Pileri et al., 1998), the scavenger receptor B type I (Scarselli et al., 2002), and the tight junction components claudin-1 and occludin (Evans et al., 2007; Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009). However, two main issues remain in our comprehension of the initial stages of HCV infection: (a) most HCV entry factors are ubiquitous and cannot account for its hepatotropism and (b) the link between these factors and molecules of the hepatocyte glycocalyx remains to be determined. Here, we report that HCV infection proceeds through a direct interaction between Synd-1 and CD81 and impacts on the hepatocyte glycocalyx during the viral propagation process.

2 | RESULTS

2.1 | Synd-1 and CD81 colocalize at the hepatocyte basolateral membrane

Synd-1 was found concentrated at the blood (basolateral) pole of primary human hepatocytes (PHH), where it partially colocalizes with CD81 (Figures 1; S1A). Dipeptidyl peptidase-4 (a.k.a. CD26) and claudin-1 were used as markers of the biliary (apical) pole. The same pattern was observed in transformed polarized HepG2c-CD81-IRF3(Δ N)-NS5A cells (HepG2c-CD81; Jammart et al., 2013; Figure 1). CD81-free HepG2 parental cells were used as controls (Figure S1B). In nonpolarized Huh7.5 cells, Synd-1 signal also coincided partially with CD81, and to a lesser extent with claudin-1, but did not merge with occludin, SR-B1 or the low density lipoprotein receptor (Figure S1C). Image correlation analyses (Bolte & Cordelières, 2006) revealed a continuous increase in Synd-1 or CD81 colocalization over 6 days (see also Figure 7a,c for visualization and quantification). Because Synd-4 was reported as an HCV entry factor (Lefèvre et al., 2014), we assessed its localization pattern; in PHH and Huh7.5 cells, Synd-4 was cytoplasmic and did not colocalize with CD81 (Figure 1, see also Figures 6a, S3A).

2.2 | HCV infection and the hepatocyte glycocalyx

Cells silenced for Synd-1 were significantly less susceptible to HCV infection than those untreated or transfected with nontargeting small interfering RNAs (siRNAs), with a drop of $\approx 80\%$ in terms of relative infectivity and HCV RNA levels (Figure 2a,c; controls: Figure S2A,B). Infectivity of a pelleted inoculum obtained from a highly viremic (1.24×10^7 IU/ml), interferon-resistant patient infected with an HCV-1b strain was also drastically reduced upon Synd-1 depletion (Figure 2a; characterization Figure S2C,D), indicating that Synd-1 plays a role in infection with HCV clinical isolates. Inhibition of HCV infection upon Synd-1 depletion was in the same range as that achieved upon CD81 depletion (Figure 2c top panels): if considering

HCV RNA levels, $80 \pm 5\%$ and $88 \pm 3\%$ inhibition were measured, respectively. This inhibition was HCV specific, as silencing of these proteins, alone or together, had an effect on HCV pseudotyped particles (HCVpp) infection, but no effect on vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped particle (VSVGpp) infection (Figure 2b). Importantly, Synd-1 silencing did not influence the expression of the key HCV receptors CD81, SR-B1, claudin-1, and occludin (Figure S3A, D, not shown), as previously reported (Shi et al., 2013).

On the basis of colocalization data, we hypothesized that Synd-1 and CD81 would cooperate in HCV infection. We therefore silenced both genes, which resulted in a significantly stronger inhibition of HCV infection than silencing each gene separately (Figure 2c bottom panels; controls: Figure S3A,C,D): in terms of HCV RNA levels, $96 \pm 1.5\%$ inhibition for the double silencing versus $80 \pm 5\%$ and $88 \pm 3\%$ for Synd-1 and CD81 single silencing, respectively. Conversely, the double knockdown of Synd-4 and CD81 genes did not result in a significant difference compared to individual gene silencing (Figure 2c bottom panels; controls: Figure S3A,C,D).

HCV infection led to the down-regulation of Synd-1 mRNA and protein expression, apparent 5 days post-infection, whereas CD81 levels remained unchanged over the same time (Figures 2d,e, S4). Claudin-1 and occludin were also down-regulated (Figure 2d), as already described (Liu et al., 2009; Tscherné et al., 2007).

One of the main components of HSPG and therefore of Synd-1 biosynthesis is xylose. It is the first sugar attached to specific serine residues of HSPG core proteins by Xylosyltransferase (Xylt) 1 or Xylt 2 activity to yield a tetrasaccharide primer that is further glycosylated, and *N*- and *O*-sulfated in the Golgi apparatus (Bishop, Schuksz, & Esko, 2007). The action of these enzymes is thus rate-limiting, and the whole glycocalyx of a given cell type is shaped by their activity. In the liver, specifically in hepatocytes, Xylt 2 expression is prominent (Pönighaus et al., 2007). We therefore assessed the silencing of Xylt 2 upon HCV infection and found a similar effect on infection as Synd-1 silencing (Figure 2c, controls Figures S2B, S3B), emphasizing the major role of HSPG of the hepatocyte glycocalyx in HCV attachment and entry. Six days after infection (Figure 3a), a trend to higher Xylt 2 mRNA levels was seen (Figure 3b), with significant increases in protein levels (Figure 3c).

2.3 | Synd-1 and CD81 are internalized together with HCV in endosomal compartments

Receptor competition experiments with an anti-Synd-1 antibody decreased HCVpp attachment to Huh7.5 cells in a dose-dependent fashion, while the anti-Synd-4 antibody used for our experiments did not act in a comparable manner, even at the highest concentrations tested (Figure S5A). The entry of HCV virions into Synd-1-immunostained cells was analyzed after synchronization at 4°C . Thirty to 45 min post-temperature shift, virion (core) signals coincided with Synd-1 at the plasma membrane (Figure 4a,d [Dunn, Kamocka, & McDonald, 2011]). After 90 min, merged intracellular signals revealed colocalization of Synd-1 and virions (Figure 4b,d; Figure S5B). This colocalization was abolished when cells were treated with heparinases before infection, where virion signals no longer coincided with heparinases-digested HSPG (i.e., with Synd-1;

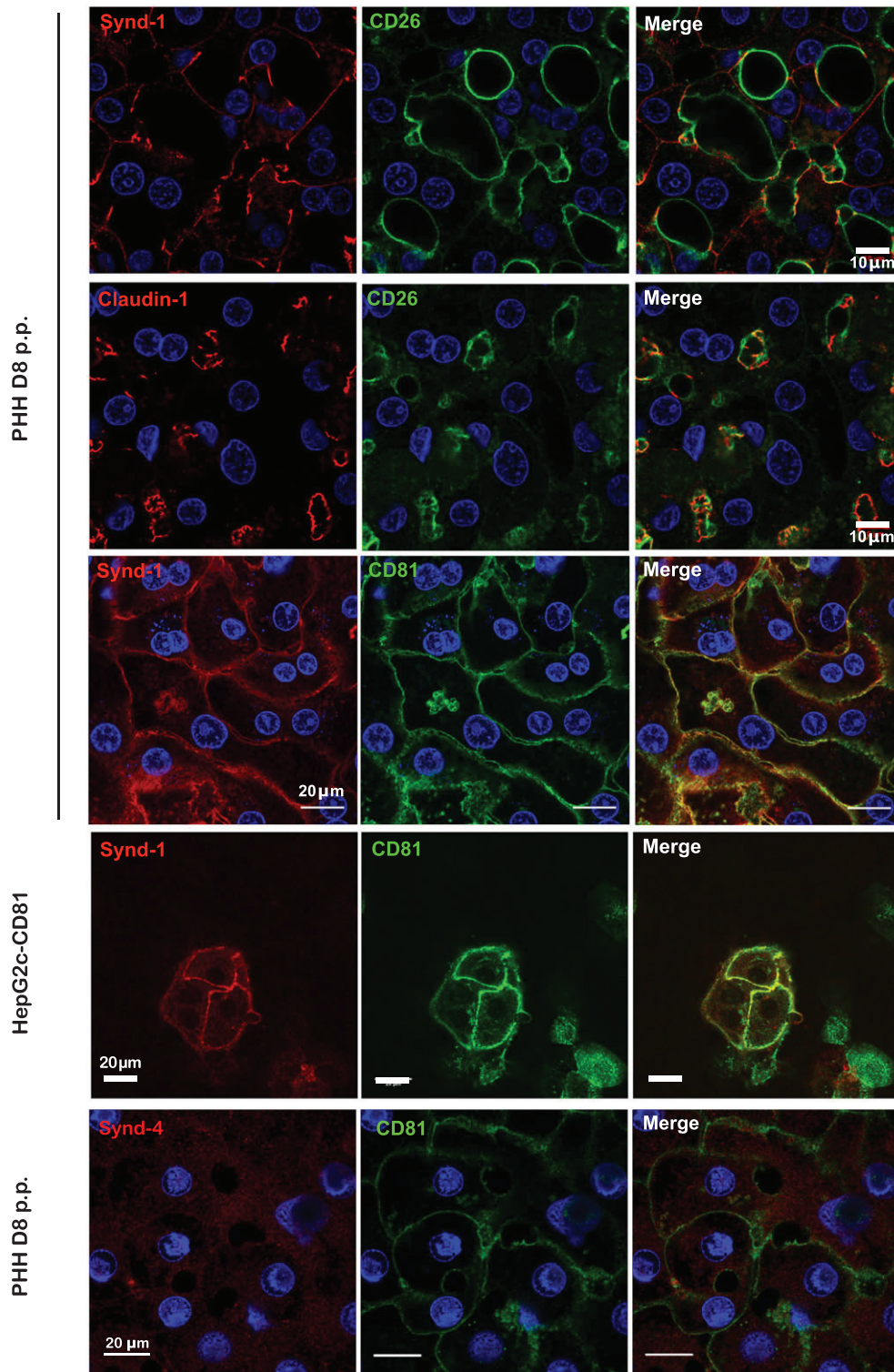


FIGURE 1 Syndecans (Synd)-1 is localized at the hepatocyte basolateral blood pole. Primary human hepatocytes (PHH) 8 days post-plating (D8 p.p.) or HepG2c-CD81 cells were fixed, stained for Synd-1 or Synd-4 (red), and CD81 (green). Claudin-1 (red) or CD26 (green) was used as apical bile pole markers. Observations were performed with a confocal spectral microscope

Figure 4c,d), highlighting the critical role of Synd-1 HS moieties for HCV binding to the hepatocyte cell surface and internalization.

We next examined the intracellular compartments where HCV and Synd-1 colocalize. Huh7.5 cells expressing green fluorescent protein (GFP)-fused Rab5 (an early endosomal marker) were infected with cell culture-grown HCV (HCVcc; Blaising et al., 2013), and the trafficking of HCV core, Synd-1, and the GFP-fusion was monitored by confocal

spectral microscopy. Virions and Synd-1-merged signals were detected in Rab5-positive endosomes after infection, although with low occurrence (Figure 5a–c). GFP-construct specificity was checked, and GFP-Rab5 targeting to early endosomes was ascertained by co-staining with EEA1 (early endosomal antigen 1; Figure S5C). Thus, virions might also be trafficking by another pathway than clathrin-dependent endocytosis when they are internalized along with Synd-1.

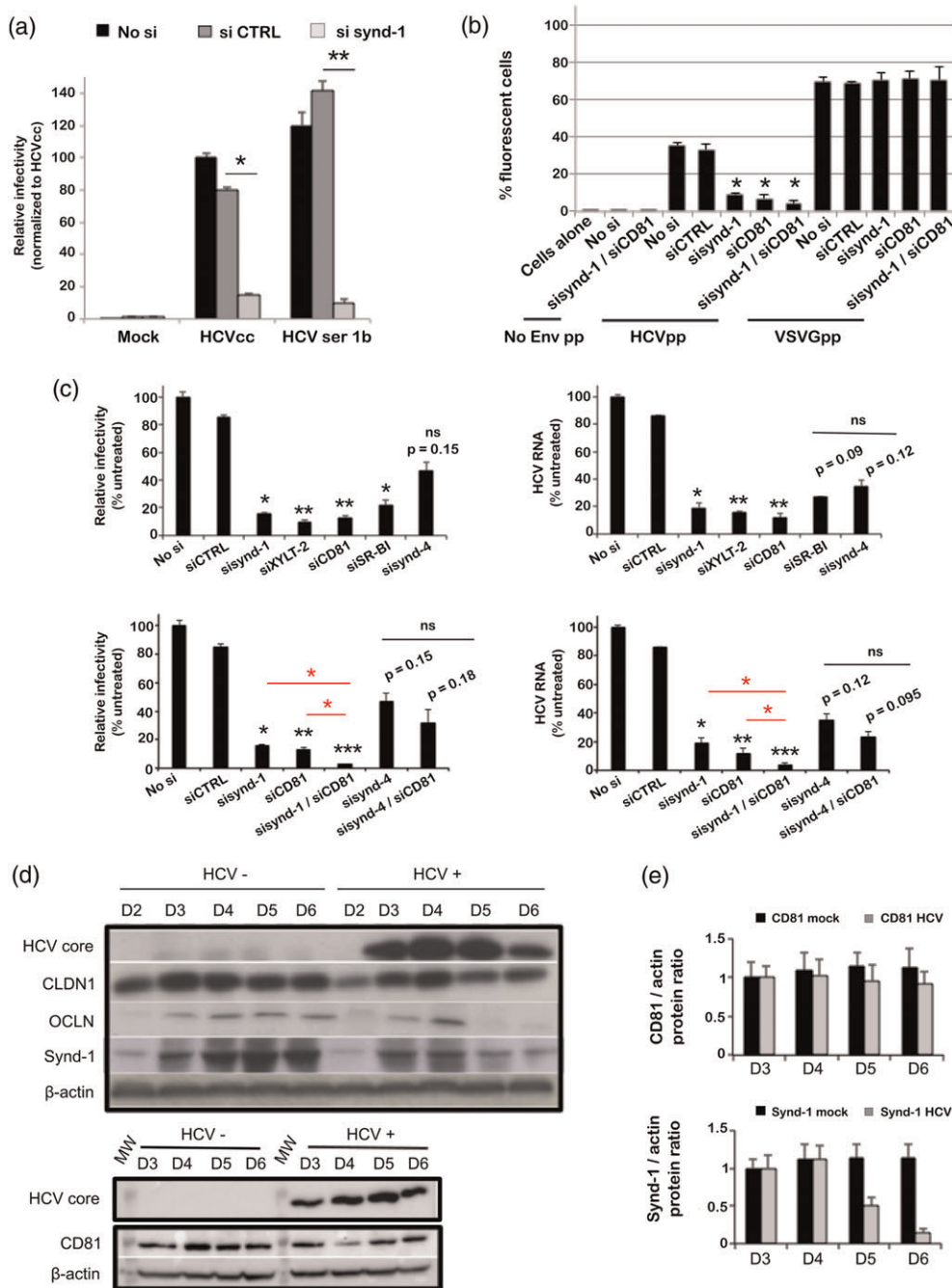


FIGURE 2 Synd-1 or CD81 co-silencing impairs hepatitis C virus (HCV) infection and infection results in downregulation of Synd-1 expression. (a) Forty-eight hours before infection, Huh7.5 cells were transfected with 70 nM of non-targeting small interfering RNA (siRNA; dark grey), or siRNA against Synd-1 (light grey), or left untreated (black). Cells were infected for 8 hr with Japanese fulminant hepatitis-1 (JFH-1) HCV (HCVcc, MOI 1) or genotype 1b HCV from the serum of an infected patient (HCVser 1b; viral load 4.8×10^7 RNA copies/ml, 25 μ l, see Figure S2C,D), or not infected (Mock). After inoculum removal and 72 hr in culture, focus forming units are counted ($n = 4$ in triplicates; *, $p < .05$; **, $p < .01$ to non-targeting siRNA, from analysis of variance and Tukey's post-hoc t test), (b) Huh7.5 cells, transfected or not with 70 nM for single or 2×35 nM for double RNA silencing, were infected or not (Cells alone) for 72 hr with No Env pp, HCV pseudotyped particles (HCVpp), or vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped particle (VSVGpp; infectious titers: HCVpp 5.1×10^5 , VSVGpp 1.18×10^7 UI/ml), expressing green fluorescent protein as the reporter gene. The percentage of fluorescent cells was then assessed by fluorescence-activated cell sorting analysis ($n = 3$ in triplicates). *, $p < .05$ to siCTRL condition, (c) Forty eight hours before infection, Huh7.5 cells were transfected with 70 nM of indicated siRNAs (top panels), or 2×35 nM in case of double silencing (bottom panels), or left untreated (No si). Cells were infected for 8 hr with JFH-1 HCV (MOI 1); focus forming units counting was performed after inoculum removal and 72 hr of culture (left panels, results are expressed as relative infectivity to untreated cells \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in triplicates). *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .005$ compared to non-targeting siCTRL; ns, not significant (with corresponding p values). HCV RNA copies were also evaluated (right panels, results expressed as percent of cells left untreated, $n = 3$ in triplicates). In red: * $p < .05$ compared to single silencing. (d) Huh7.5 cells were infected or not with JFH-1 HCV (MOI 0.1) for indicated days. Cell lysates in CHAPS buffer were assayed by western blot (WB) and probed against (top panel) HCV core, Claudin-1, occludin, Synd-1, and β -actin; (bottom panel) HCV core, CD81, and β -actin. A representative WB is shown for each condition, and (e) Quantification of CD81 and Synd-1 protein signals from three western blots as in D, using ImageJ software; normalization was done to β -actin and set arbitrarily to 1 at D3

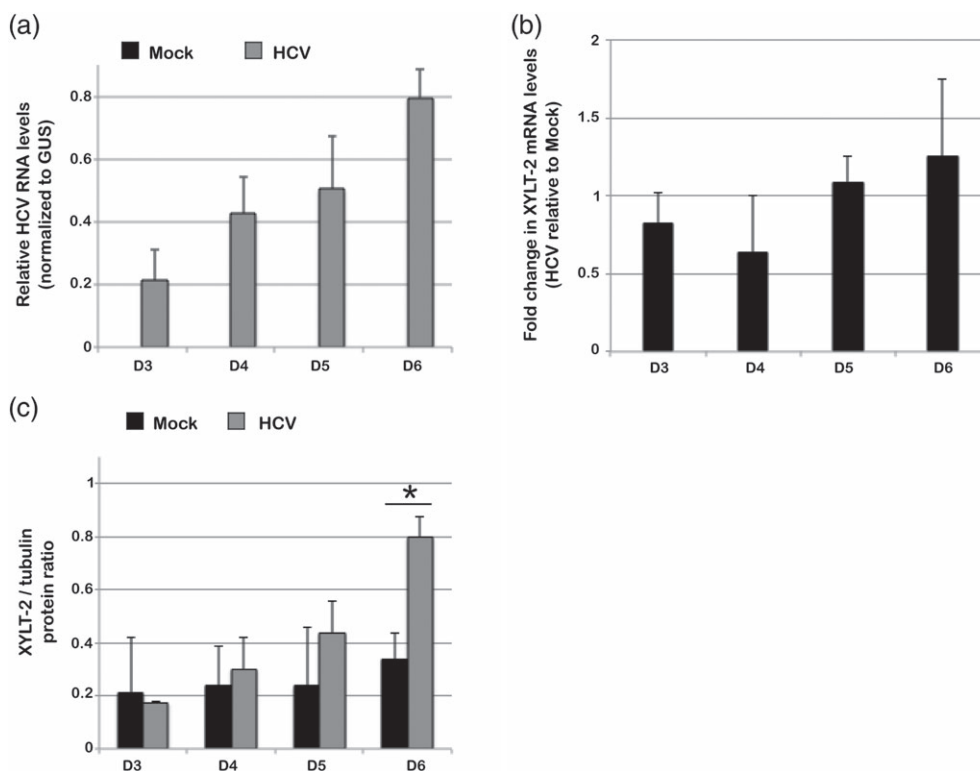


FIGURE 3 HCV infection up-regulates Xylt 2 expression. Huh7.5 cells were infected (HCV) or not (Mock) with JFH-1 HCV at MOI 0.1 for indicated days. (a) Cells were lysed in TRIzol® and RT-qPCR was performed to quantify HCV RNA levels ($n = 4$ in triplicates; normalization to GUS), (b) Xylt 2 mRNA levels were quantified in parallel, and (c) Quantification of Xylt 2 protein signals normalized to tubulin, from three western blots, using ImageJ software (*, $p < .05$)

2.4 | Interaction between Synd-1 and CD81

To further explore the possibility of a direct interaction between Synd-1 and CD81 and how such interaction might behave during HCV infection, we performed immunoprecipitation experiments and in situ proximity ligation assays (PLA) in living cells. Synd-1 immunoprecipitated with CD81 in (uninfected) PHH and Huh7.5 cell lysates, under conditions optimized for CD81 detection (Horváth et al., 1998; Figure 6a left panel). No complex formation was observed with flotillin-1—a marker of lipid microdomains involved in clathrin-independent endocytosis (Hansen & Nichols, 2009), although flotillin-1 is extractible by Brij-containing buffers (Brügger et al., 2006). In spite of numerous attempts, we could not find biochemical conditions that allowed the simultaneous detection of CD81 and Synd-1. Indeed, tetraspanin detection requires mild detergent extraction conditions and nonreduced SDS-PAGE (Horváth et al., 1998), while Synd-1, because of its high level of glycosylation, can only be detected on reduced SDS-PAGE after stringent detergent extraction. Under optimized conditions, Synd-1 was retained on CD81-harboring beads (Figure 6a right panel), whereas flotillin-1 and, interestingly, Synd-4 were not.

The Synd-1 or CD81 interaction was further explored by PLA (Söderberg et al., 2006): Synd-1 and CD81 massively colocalized in primary hepatocytes (Figure 6b green dots; Figure 6c), or transformed HepG2c-CD81 and Huh7.5 hepatocytes (Figure S6). The specificity of this interaction was ascertained by omitting the primary antibody (Figure 6b,c; Figure S6B,C), or in HepG2 cells constitutively devoid of CD81 (Figure S6A). Additional control experiments to evaluate potential interactions between flotillin or Synd-4 with CD81 showed

that none of these proteins colocalized with CD81 (Figure 6b,c), in agreement with the results obtained by co-immunoprecipitation.

In HCVcc-infected PHHs (Figure 6b,c), and also in Huh7.5 cells transduced with the IPS-RFP-NLS construct before infection (Figure S6B,C; Jones et al., 2010), colocalization was significantly reduced. This construct was used to assess HCV infection in Huh7.5 cells, in order to limit the number of antibodies used for the PLA strategy and readily visualize infected cells in the red channel of the microscope.

A plausible explanation is that HCV infection downregulates Synd-1 biosynthesis (Figure 2d,e), with the remaining Synd-1 pool still involved in the interactions with CD81. A second explanation could be that the decrease in the Synd-1 or CD81 signal observed in PLA might be due to an intrinsic loss of interaction between Synd-1 and CD81 during HCV infection, implying a relocalization of Synd-1. To address this question in the context of the persistent infection, we only used HCV-infected Huh7.5 cells for detailed analyses in the following. After an initial increase in colocalization over 4–5 days, comparable to mock conditions, Synd-1 or CD81 interaction decreased in HCV-infected cultures (Figure 7). Cross-correlation analyses confirmed the progressive decrease and even loss of colocalization with time upon infection (Figure 7c; Manders, Verbeek, & Aten, 1993). Analyses with Manders' coefficients take into account the relative amounts of each protein and their difference in fluorescence intensity, which thus allows the evaluation of the fraction of each protein overlapping with the other. The observed decrease in Synd-1 or CD81 colocalization during infection cannot therefore be merely attributed to HCV-induced down regulation of Synd-1 expression. This

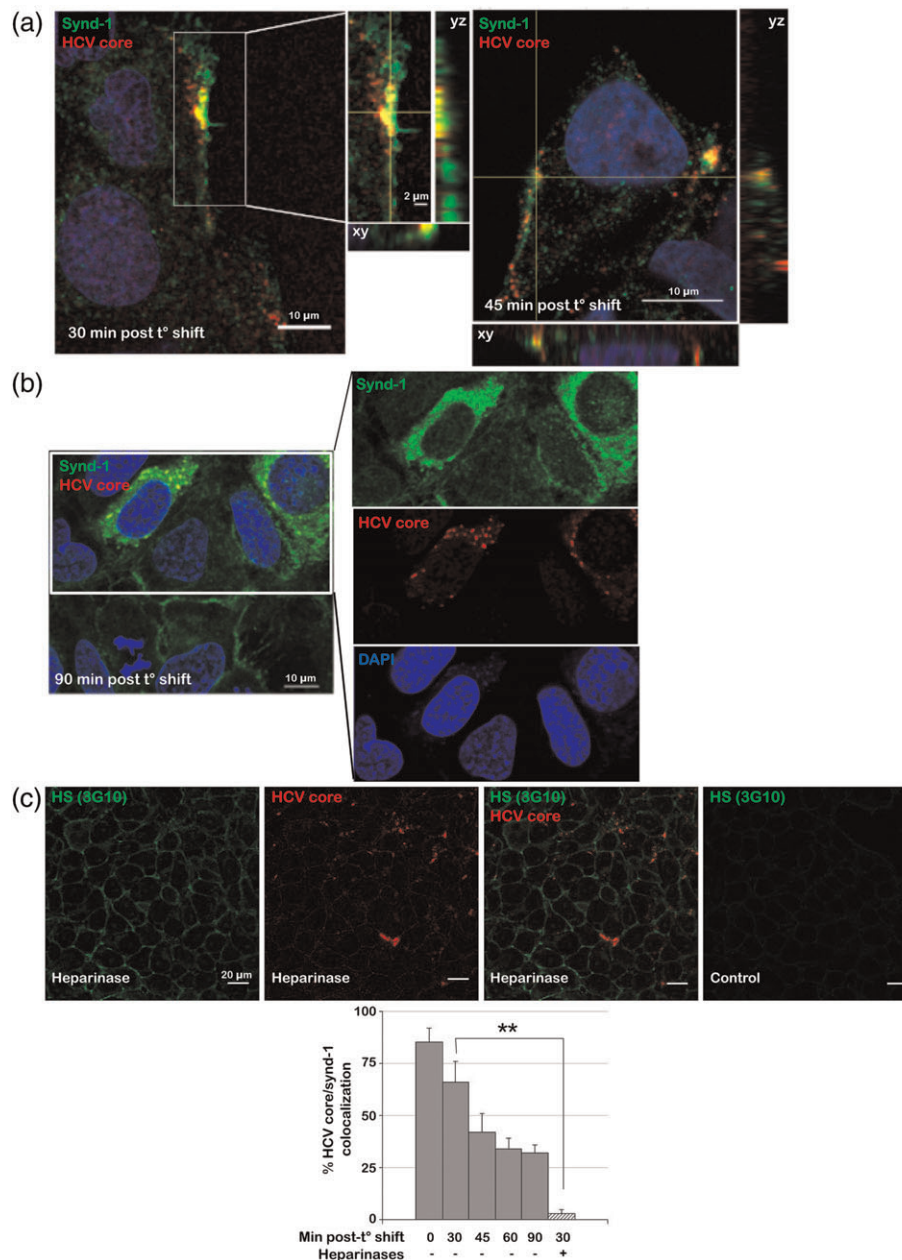


FIGURE 4 Synd-1 and HCV are co-internalized. (a) Huh7.5 cells were incubated at 4 °C for 1 hr with JFH-1 HCV (MOI 3), and shifted to 37 °C for indicated times. After inoculum removal, cells were fixed and immunostained for HCV core (red) and Synd-1 (green), using appropriate secondary antibodies coupled to Dylight® or AlexaFluor®. Representative images are shown with orthogonal sections, and imaging was performed on a confocal spectral microscope. Bar, 10 μm, (b) same procedure as in A, 90 min post temperature shift. Each separate color channel is shown, (c) Huh7.5 cells were treated with heparinases I, II, and III (Heparinase; David et al., 1992) or not (Control). After washing, cells were placed at 4 °C and incubated with JFH-1 HCV (MOI 3) for 1 hr, then shifted to 37 °C for 30 min. Immuno-staining was done with monoclonal antibodies C7-50 against HCV core (red), and 3G10 that reacts only with heparinase-treated oligosaccharide chains (HS; green; David et al., 1992), and (d) The degree of colocalization of HCV particles (core) with Synd-1, at indicated times post-temperature shift, was quantified by determining Pearson's correlation coefficients (Dunn et al., 2011). Results, mean ± SD ($n = 3$, 50 cells counted per experiment; ** $p < .005$ between conditions at 30 min without or with heparinases treatment)

downregulation was indeed already observed 5 days after infection (Figure 2d), even though Synd-1 still colocalized with CD81 (Figure 7b,c). Additional (cross)-correlation analyses were performed to confirm this observation using a classical approach per surface unit (Figure S7A) or more sophisticated methods such as Li's (Figure S7B) and Van Steensel's (Figure S8). All modes of calculation pointed to a reduction of Synd-1 or CD81 colocalization upon HCV infection, with a sharp decrease after 6 days. Taken together, our data indicate

that Synd-1 plays a role during early and late stages of HCV infection, most likely through its physical interaction with CD81.

3 | DISCUSSION

Blood-borne hepatotropic viruses cross the space of Disse while leaving the blood stream through the fenestrae of sinusoid capillaries

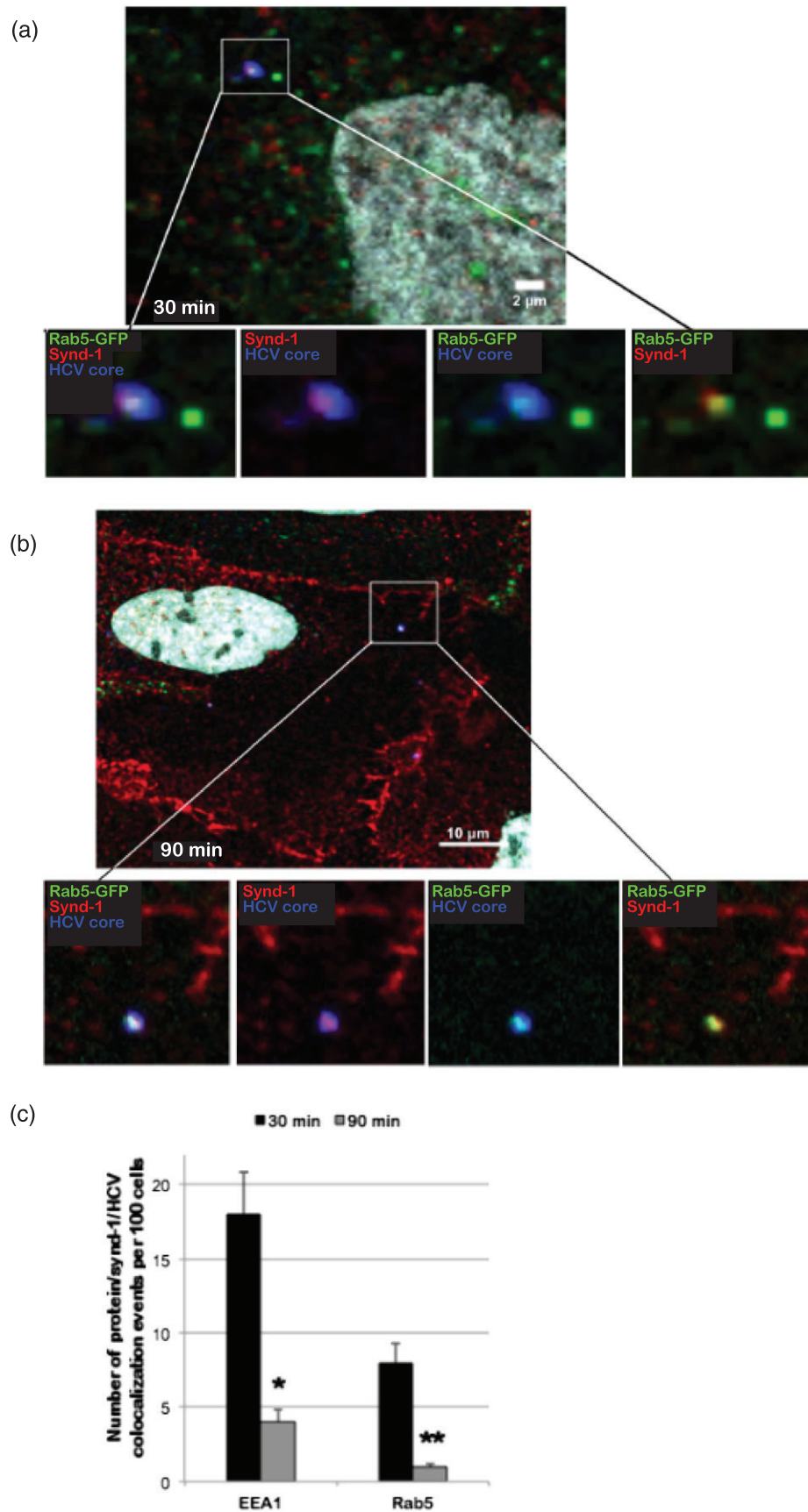


FIGURE 5 Synd-1 and HCV are internalized in endosomal compartments. Huh7.5 cells, transduced with green fluorescent protein-fused Rab5 (green), were inoculated with JFH-1 HCV (MOI 3) for 1 hr at 4 °C, then shifted to 37 °C for 30 min (a) or 90 min (b). After fixation, cells were labeled for Synd-1 (secondary: AlexaFluor®555; red) and HCV core (secondary: AlexaFluor®647; false color blue), and observed with a confocal spectral microscope. (c) Quantification of the number of triple colocalization events between Synd-1, HCV core, and indicated endosomal markers, counted in 100 cells; 30 min/90 min, time after transfer of HCV-infected cells to 37 °C. Results, mean \pm SD ($n = 3$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

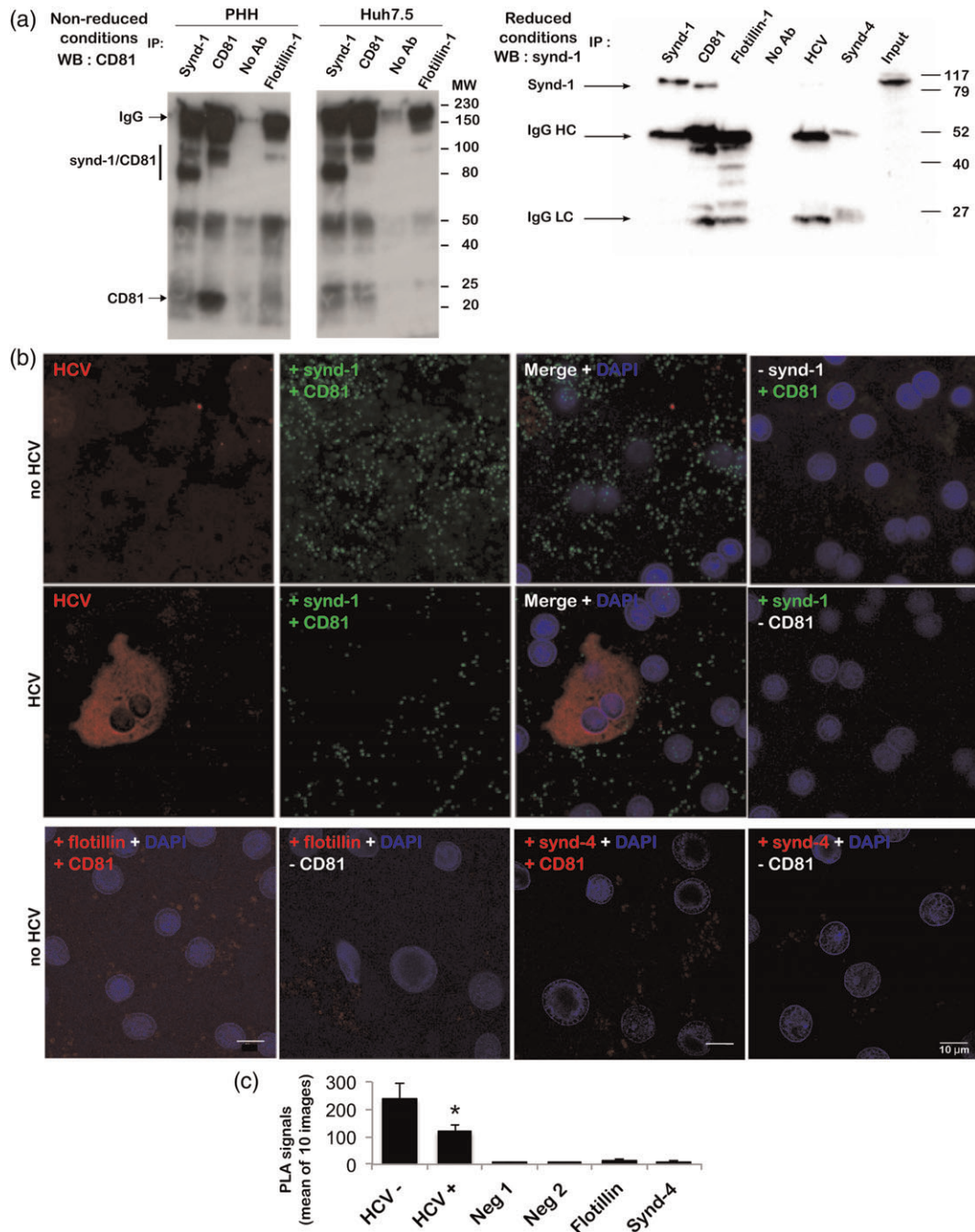


FIGURE 6 Interactions between Synd-1 and CD81: Co-immunoprecipitation and proximity ligation assay. (a) Left panel: Immunoprecipitation of Synd-1 and CD81 in PHH and Huh7.5 cells and detection of CD81. Protein A/G sepharose beads, coated with no antibody (No Ab) or indicated antibodies (top: IP), were incubated with cell lysates prepared in Brij97 buffer (see Methods). After extensive washings, beads were boiled and their protein content analysed by SDS-PAGE under non-reduced conditions for CD81 detection. This was followed by WB with monoclonal anti-CD81. Flotillin-1 was used as a membrane-associated control protein. Molecular weights are indicated on the right, and identical volume of precipitated material was deposited in all lanes. Right panel: Immunoprecipitation of Synd-1 and CD81 in Huh7.5 cells and detection of Synd-1. Protein A/G sepharose beads, coated with no antibody (No Ab) or indicated antibodies (top: IP), were incubated with cell lysates prepared in Triton X-100 buffer (see Methods). After extensive washings, beads were boiled and their protein content analysed by SDS-PAGE under reduced conditions for Synd-1 detection. This was followed by WB with monoclonal anti-Synd-1. Flotillin-1 was used as a membrane-associated control protein and HCV core (HCV) as a negative control. Molecular weights are indicated on the right, and identical volume of precipitated material was deposited in all lanes. IgG HC and LC, IgG heavy and light chains, respectively, (b) proximity ligation assay (PLA) was performed in PHH infected or not by JFH-1 HCVcc for 4 days (panels "no HCV" and "HCV"). Representative images are shown (see Methods). Right: controls without Synd-1 or CD81 primary antibody. In PHH not infected by HCV, PLA was also performed between flotillin and CD81 on one hand (bottom left panels) and between synd-4 and CD81 on the other hand (bottom right panels). Controls where anti-CD81 antibody was omitted were included, and (c) quantification of PLA fluorescent dots in uninfected and HCV-infected PHH; negative controls « Neg 1 » and « Neg 2 » represent PLA signals in infected cells where anti-Synd-1 or anti-CD81 antibodies were omitted, respectively. Flotillin and Synd-4: quantification of PLA signals in uninfected PHH, assayed for flotillin/CD81 and Synd-4 or CD81 interactions, respectively. Results, mean \pm SD of countings on 10 images (*, $p < .05$ comparing Synd-1 or CD81 signals between HCV-infected and non-infected PHH)

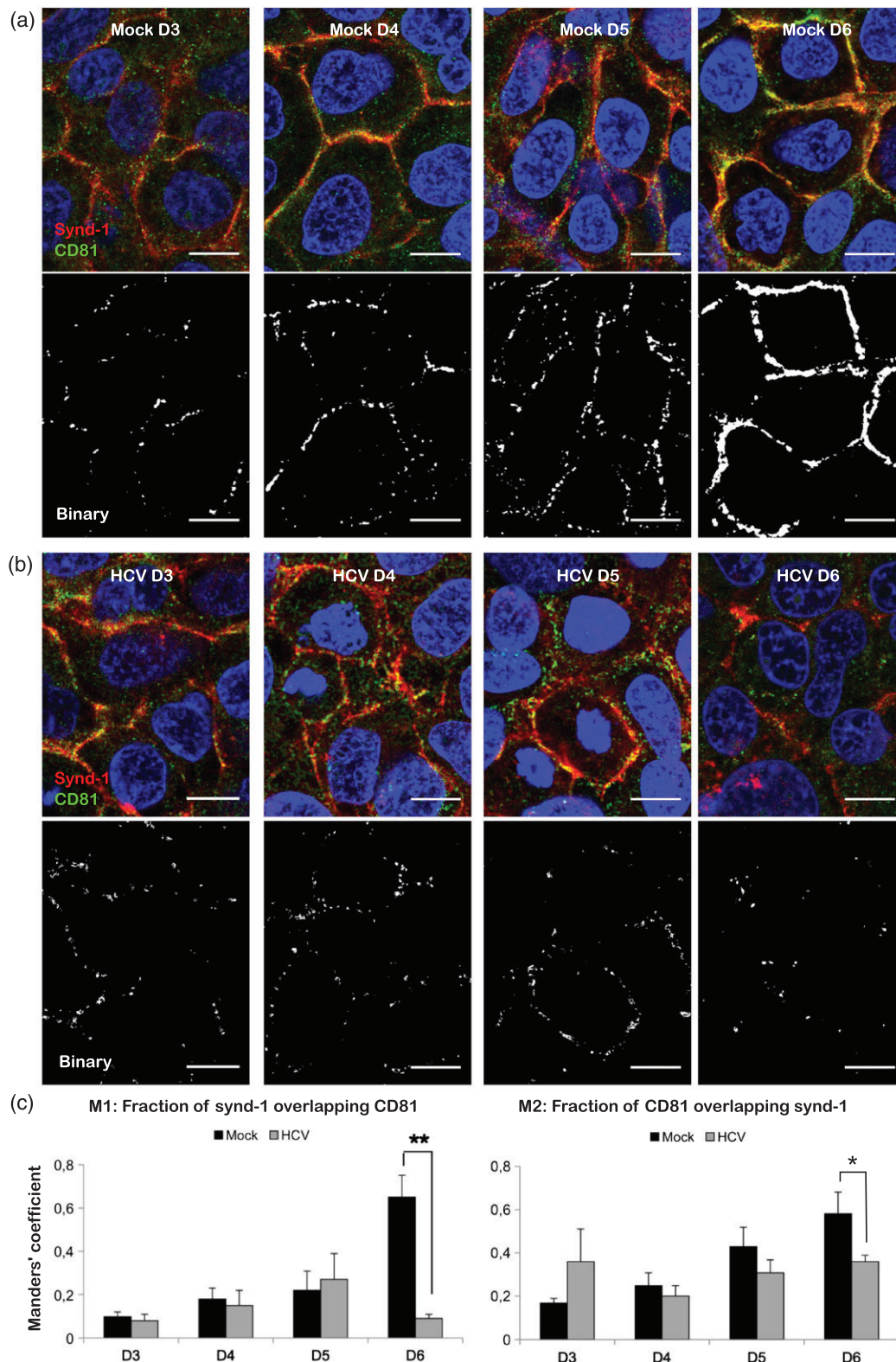


FIGURE 7 Synd-1 or CD81 colocalization decreases during HCV infection. Huh7.5 cells grown on coverslips were infected or not with JFH-1 HCV (MOI 0.1), and fixed at days 3 (D3), 4 (D4), 5 (D5), and 6 (D6) post-infection. This was followed by immunostaining of CD81 (green) and Synd-1 (red), with DAPI nuclei counterstaining (blue). Coverslips were imaged with a confocal spectral microscope. Stacks were acquired by sequential acquisition, exciting one fluorochrome at a time. Analyses were performed using ImageJ on Z-stacks of 4 μm (0.8 μm per slice), taken in six different regions of the cell culture ($n = 2$). Colocalization analyses were performed using ImageJ plugin JACoP (Bolte & Cordelières, 2006). Panels A and B, top: evolution of CD81 and Synd-1 labelings in mock- (a) or HCV-infected cells (b; one representative experiment); bottom: binary images representative of Synd-1 or CD81 colocalization, obtained by the object-based analysis. Bar, 10 μm , and (c) Evolution over time of Manders' coefficients in mock- or HCV-infected cells. M1, fraction of Synd-1 overlapping CD81; M2, fraction of CD81 overlapping Synd-1. Results are expressed as mean \pm SD from Z-stacks taken in 6 different regions of the cell culture, from two separate experiments (*, $p < .05$; **, $p < .01$ comparing mock- and HCV-infected cells)

to reach hepatocytes. Therein, they encounter the hepatic extracellular matrix, and more specifically at the hepatocyte membrane, the glycocalyx. Here, we provide evidence that Synd-1, a glycocalyx component, plays a major role in HCV entry and infection of hepatocytes through a direct interaction with CD81. This occurs at an early infection stage, leading to virus internalization in Rab5-positive endosomal compartments. Synd-1 can thus be viewed as a CD81 cofactor of HCV entry.

Synd-1 is expressed at the surface of epithelial cells, exposed to the space of Disse in the liver (Stanford et al., 2009), at the hepatocyte blood pole where it colocalizes with CD81 and partially with claudin-1 (our data). In normal and HCV-infected livers, CD81 and claudin-1 are present at this pole (Reynolds et al., 2008), forming complexes endocytosed along with HCV particles (Farquhar et al., 2012; Harris et al., 2010). The proximity of Synd-1, CD81, and their co-internalization with virions further supports the notion that HCV directly interacts with entry factor complexes at the basolateral membrane. Physical interactions between Synd-1 and CD81 revealed by immunoprecipitation and PLA emphasize the functional relevance of this complex to HCV infection, together with the additive inhibitory effect of Synd-1 or CD81 double knockdown. Contrary to Synd-1, Synd-4 is ubiquitously expressed and localizes to cellular focal adhesions with paxillin (Woods & Couchman, 2001). Its expression pattern at the hepatocyte surface greatly differs from that of Synd-1 (our data; Sutton et al., 2007), and we show that it does not colocalize nor interact with CD81. Functionally, the Synd-4 or CD81 double knockdown did not exert any significant additive inhibitory effect on HCV infection. The report of Synd-4 as an HCV entry factor therefore leaves open potential interactions of Synd-4 with other HCV entry receptors (Lefèvre et al., 2014).

Synd function is regulated by endocytic trafficking (Lambaerts, Wilcox-Adelman, & Zimmermann, 2009); notably Rab5 binding to the Synd-1 cytosolic domain mediates its internalization (Hayashida, Stahl, & Park, 2008). Our data are the first description of an element of the hepatocyte glycocalyx internalized with HCV. CD81 and Rab5 are the major actors of the productive infection of hepatocytes by HCV (Coller et al., 2009; Farquhar et al., 2012), and HCV induces CD81 internalization via clathrin-dependent endocytosis (Farquhar et al., 2012). Synd-1 has been described as an HCV attachment factor (Shi et al., 2013), and the concept that both HSPG and CD81 are important for HCV entry was highlighted by Wakita's group (Morikawa et al., 2007). Our data therefore unravel a new link between HCV receptor molecules and the hepatocyte glycocalyx, namely, CD81 and Synd-1.

Our study shows that HCV infection downregulates Synd-1 and upregulates Xylt 2 expression, likely contributing to a major glycocalyx reshuffle within days. As obligate intracellular pathogens, viruses remodel their host cells for propagation, survival, and persistence. The downregulation of entry factor(s) by HCV (Liu et al., 2009; Sainz et al., 2012) was proposed to explain the so-called exclusion of superinfection, also observed in clinical settings (Laskus et al., 2001; Ramírez et al., 2010), whereby an established viral infection prevents a secondary infection with the same virus. The downregulation of Synd-1 expression by HCV infection could contribute to this phenomenon. The density of Synd-1 at the hepatocyte surface has been evaluated to be 10^6 molecules (Stanford et al., 2009), while no

infection by HCV could be observed below 7.10^4 CD81 molecules per cell (Koutsoudakis, Herrmann, Kallis, Bartenschlager, & Pietschmann, 2007). This suggests that the surface density of Synd-1 is much higher than that of CD81. During infection, the observed loss of Synd-1 or CD81 colocalization, reflecting the loss of interaction between the two molecules, is therefore independent of their relative densities. The suppressive effect of Xylt 2 silencing on infection reveals the key contribution of this enzyme to hepatocyte invasion by HCV. The HCV-induced upregulation of Xylt 2 expression might also play a role in superinfection exclusion and viral persistence, through alterations in the biosynthetic pathway of HSPG, and subsequent modifications of the HSPG "landscape" at the hepatocyte surface. The glycocalyx in which HSPGs are lying is a delicate coating, where alterations occurring in any of its components are expected to bring about alterations or loss of function of the entire glycocalyx (Reitsma, Slaaf, & Vink, 2007).

Liver HSPG (including Synd-1) harbour HS sugar chains that are highly sulfated at N- and 2-O-positions, with a higher sulfatesper-saccharide amount and a shorter length than those found in other tissues (Lyon, Deakin, & Gallagher, 1994; Toida et al., 1997). This renders liver HS moieties unique in their structure, and their high level of sulfation could maximize binding sites for natural ligands and pathogens. It has been calculated that HS can occur as 10^{36} different structures (Dietrich, Nader, & Straus, 1983), but specificity in pattern recognition is highly stringent: for example, antithrombin only binds to specific pentasaccharides (Mosier, Krishnasamy, Kellogg, & Desai, 2012). In all, the Synd-1 or CD81 complex can be viewed as a "landing platform" for HCV because (a) Synd-1 specifically localizes to the basolateral blood pole of hepatocytes (our data; Stanford et al., 2009), (b) liver HS has a specific composition, (c) ligand binding to HS chains induces a « kink » in the repeat pattern of these chains, thereby providing specificity (Sasisekharan & Venkataraman, 2000), (d) CD81 plays a key role in HCV entry and forms a complex with Synd-1, (e) HCV is of lipoprotein nature (Bartenschlager, Penin, Lohmann, & André, 2011), and (f) Synd-1 is the primary proteoglycan receptor for lipoproteins of very low density (Stanford et al., 2009). All these features might create a specific combination at the hepatocyte blood pole that could represent the foundation of HCV infection tropism.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Reagents and antibodies

CellLight® Early Endosomes (Rab5a)-eGFP *BacMam 2.0*, Hoechst 33342 dye, Dylight® 488, 594 or 647-, or AlexaFluor-conjugated secondary antibodies were from Thermo-Fisher Scientific; antibody specificities were confirmed in each staining experiment. Proximity ligation assay kit duolink® and monoclonal antibody to β -actin were from Sigma-Aldrich. Monoclonal antibodies to CD81 (TS81), claudin-1 (1C5-D9), SR-BI (EP1556Y), rabbit polyclonal antibodies to Xylt 2, claudin-1, occludin, and isotype controls were from Abcam. A human anti-HCV serum was also used (see PLA). Rabbit polyclonal antibodies to human Synd-1 (H-174), Synd-4 (H-140), CD81 (H-121), monoclonal antibodies to Synd-4 (5G9), HCV core (C7-50), Synd-1

(DL-101), and Synd-4 (5G9) were from Santa Cruz. Anti-Synd-1 (clone B-B4) fused to AlexaFluor®647 was from AbD Serotec. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were from Sigma-Aldrich. The monoclonal antibody 3G10 to HSPG neo-epitope (exposed after heparinases' digestion) was from Seikagaku, Japan. The monoclonal antibody to occludin (OC-3F10) was from CliniSciences (Nanterre, France). The anti-LDL-R monoclonal antibody IgG-C7 was from Research Diagnostics Institute. Paraformaldehyde (16% aqueous solution) was from Electron Microscopy Sciences.

4.2 | Cells and viruses

PHHs were isolated from liver resections and cultivated as described (Pichard et al., 2006). The isolation procedure complied with the ethical regulations imposed by French legislation on usage of surgical liver samples unused for diagnostic purpose and approved by the "Comité Consultatif de Protection de Personnes dans la Recherche Biomédicale" (Centre Léon Bérard, Lyon). Huh7.5 cells were a gift from Dr. Rice (Rockefeller University, NY, USA). HepG2c-CD81-IRF3(ΔN)-NS5A cell line (HepG2c-CD81) was established and cultivated as described (Jammart et al., 2013). HepG2 parental cells were from ATCC® (HB-8065™). Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum, 1X GlutaMAX, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in 5% CO₂-normoxia incubator at 37 °C. HCV Japanese fulminant hepatitis-1 (JFH-1) stock preparation and titration were performed as reported (Wakita et al., 2005).

4.3 | HCVcc particles generation

The plasmid containing the full-length JFH-1 genome (pJFH1) was provided by Dr Wakita (Tokyo, Japan). All subsequent procedures to produce viral particles (HCVcc) were described in (Jammart et al., 2013).

4.4 | Highly viremic patient's serum characterization

A clinical study approval was obtained from the French AFSSAPS (agreement #B100128-40) and Ethics Committee (agreement #2010-008-2) in order to purify HCV virions from human plasmas. Among several HCV-positive patients, we identified one highly viremic (1.24×10^7 IU/ml) and IFN-non responder patient. The density profile of the virions was assessed after ultracentrifugation on iodixanol isopycnic linear density gradients, as described (Nielsen et al., 2006), and their replication potential in Huh7.5 cell cultures.

4.5 | Virus infectivity

Virus infectivity in culture supernatants was assessed as focus forming units (FFU/mL), counting HCV core foci.

4.6 | Pseudoparticles generation

Production of HCVpp or VSVGpp or pseudoparticles devoid of envelope glycoprotein (No Env pp), expressing GFP as the reporter gene, was achieved in 293 T cells, as described (Bartosch, Dubuisson,

& Cosset, 2003). These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum, 1X GlutaMAX, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, supplemented with 1 mg/ml geneticin, in 5% CO₂-normoxia incubator at 37 °C.

4.7 | RNA quantification

Total intracellular RNA was extracted using TRIzol®, according to manufacturer's protocol. Samples were treated with DNase prior to reverse transcription on 1 µg RNA, using High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems). cDNAs were diluted 1:5 and mixed with SYBR® Green polymerase chain reaction (PCR) Master Mix (Roche) in 10 µl final. Quantitative PCR was performed on a QuantStudio™ Real Time PCR (Life Technologies) using specific primers:

Synd-1 fw: 5'-GCTGACCTTCACACTCCCCA-3', rev: 5'-CAAA-GGTGAAGTCCTGCTCCC-3'.

CD81 fw: 5'-CCTCCTGTATCTGGAGCTGG-3', rev: 5'-TTGG-CGATCTGGTCCTTGTG-3'.

Xylt 2 fw: 5'-CGAGAAAGGAAGGCAGAGGAAG-3', rev: 5'-TTA-CTGCCCGTACCACCTTG-3'.

Forty five cycles were performed at an annealing temperature of 60 °C. For HCV, the amplification was performed with RC1 and RC21 primers (Komurian-Pradel et al., 2001). B-Glucuronidase (GUS) gene was used as reference.

4.8 | siRNA knockdown

Specific pools of siRNAs were from Dharmacon (On-Targetplus SMARTpool®), which developed proprietary chemical modifications to minimize off-target effects (<http://dharmacon.gelifsciences.com/uploadedFiles/Resources/off-target-tech-review-technote.pdf>):

Synd-1: CGCAAUUGUGGCUACUAA, CCAAACAGGAGGAUUCUA, GGAGAAUACGGCUGUAGUG, GAGCAGGACUACCUUUG.

Synd-4: GAUCGGCCUGAAGUUGUC, GUGAGGAUGUGUCCA-ACAA, GAAUCUCACCCGUUGAAGA, UAGAGGAGAAUGAGGUUAU.

Xylt 2: CCGGAGGUUUGUAGAAUUAU, CCUGUAUUUCUAUGA-CGAC, CGAGCAGCACUUCUUUAC, GUAAAAGAAGUGCUGCUCG.

CD81: CCAAGGAUGUGAAGCAGUU, GCCCAACACCUUCUA-UGUA, UCAGCAACCUCUUAAGGA, CCACCAACCUCCUGUAUCU.

SR-BI: GAACGUGCGCAUCGACCCC, AGUAGCCUGUCCUUC-AACA, AGCGAGAUCUGAAGGGCG, UUGCAGAGAGCGGGGCCAU.

One day before siRNA transfection, Huh7.5 cells were plated in complete medium. Transfection (70 nM siRNA final) was performed according to manufacturer's protocol (JetPRIME® Polyplus). After 48 hr, cells were either lysed for gene silencing evaluation or infected 2 hr at 37 °C with JFH-1 HCV (MOI 1) or genotype 1b serum HCV (25 µl, viral load $4.8 \cdot 10^7$ RNA copies/ml), or No env pp, VSVGpp, or HCVpp. Unbound virions were removed by washing with PBS, and 24 hr later, viral RNA was extracted with TRIzol® (Invitrogen) and quantified by RT-qPCR. On parallel cell batches, virus infectivity was determined. After 72 hr in culture, cells fixed in

methanol or acetone were immunostained for HCV core and focus forming units counted. For pseudotyped particles infection, percentages of fluorescent cells were evaluated by fluorescence-activated cell sorting analysis.

4.9 | Western blotting

Cells were lysed in 1% CHAPS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), supplemented with proteases inhibitors (Roche). Lysates were denatured 5 min at 95 °C in Laemmli buffer and proteins separated by SDS-PAGE (non-reducing conditions for CD81 detection; Horváth et al., 1998). After protein transfer onto nitrocellulose, immunodetection of Synd-1, CD81, Xylt 2, and HCV core was performed using, respectively, monoclonal DL-101 (1:500) or polyclonal H-174 (1:2000); TS81 (1:1000); polyclonal anti-Xylt 2 (1:800); and C7-50 (1:1000). Equal loading was controlled through β -actin or tubulin (1:5000). Secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to detect proteins by enhanced chemiluminescence.

4.10 | Immunofluorescence (IF) and confocal microscopy imaging

Huh7.5 cells (200,000 per well), seeded on glass coverslips in six-well plates for 24 hr, were infected or not with HCVcc (MOI 0.1) for 3, 4, 5, or 6 days, washed with PBS and fixed 10 min with methanol at -20 °C. PHHs were fixed 10 min in methanol or acetone (1:1) at -20 °C. After washing, blocking in PBS/3% bovine serum albumin (PBS-BSA) was performed. Incubation with primary antibodies in PBS-BSA was performed for 1 hr 30 at RT. After three washes in PBS-BSA/0.1% Tween 20, cells were incubated 1 hr at RT with secondary antibodies diluted in PBS-BSA. Coverslips were washed in PBS-BSA-Tween, then PBS-BSA and finally mounted on glass slides using mounting medium (Dako), for observation on a Leica Confocal Spectral TCS SP5X microscope. The ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used to process images and monitors the degree of HCV or Synd-1 colocalization through Pearson's correlation coefficients (Dunn et al., 2011). For co-IF, fluorochromes to view CD81 and Synd-1 (DyLight®488 and Alexa Fluor®647, respectively) were chosen to have an emission spectrum as distinct as possible. Analyses were performed using ImageJ on Z-stacks of 4 μ m (0.8 μ m per slice), taken in six different regions of the cell culture. Stacks were acquired by sequential acquisition, exciting one fluorochrome at a time. The ImageJ plugin JACoP (Bolte & Cordelières, 2006) was used to perform correlation analyses based on Pearson's coefficient, such as the calculation of Manders' coefficients (Manders et al., 1993). To avoid subjective observations, a blind treatment and/or blind observations were performed. Calculation of Manders' coefficients consists in the statistical analysis of the correlation of the intensity values of red and green pixels in a dual-channel image. This relies on individual pixel coincidence analysis, considering that each pixel is part of the image and not of a unique structure, and takes into account the relative amounts of each protein and their difference in fluorescence intensity. Noise was corrected, and structural pixels corresponding to Synd-1 or CD81 signals were identified by applying a threshold to images in

order to obtain a representative mask of Synd-1 and CD81. These masks were then used for conversion into binary images, from which calculations were done to create a new image corresponding to the colocalization signal. For Manders' approach, the fraction of Synd-1 overlapping with CD81 (M1) and that of CD81 overlapping Synd-1 (M2) are calculated. Colocalization analyses are the result of the average of Manders' coefficients obtained for each stack at each time point, respectively.

For some experiments, Huh7.5 cells were transduced with the CellLight® Early Endosomes (Rab5a)-eGFP *BacMam 2.0* (Blaising et al., 2013). Cells washed with DMEM were inoculated away from light with highly purified JFH-1 HCVcc (MOI 3), for 1 hr at 4 °C to synchronize viral entry. Unbound virions were discarded by washing with ice-cold PBS. Cells were then placed for 30 or 90 min in a 37 °C-thermostated incubator under a 5% CO₂ atmosphere. After cell fixation in cold paraformaldehyde (2% final), indirect IF was performed using the rabbit anti-Synd-1 polyclonal ZMD.289 antibody and the mouse monoclonal anti-HCV core C7-50 antibody. Immuno-staining was achieved with secondary anti-rabbit coupled to DyLight®555 and anti-mouse coupled to AlexaFluor®647. Imaging was performed using a Leica Confocal Spectral TCS SP5X microscope.

4.11 | Removal of heparan sulfate by heparinases treatment (David, Bai, Van der Schueren, Cassiman, & Van den Berghe, 1992)

Huh7.5 cells, seeded at 40,000 per well in 12-well plates, were treated 24 hr post-plating with 10 U/ml of heparinases I, II, and III diluted in DMEM, for 30 min at 37 °C. Cells were then washed three times with PBS and incubated with JFH-1 HCV at 4 °C for 1 hr, followed by a temperature shift to 37 °C for 10 min. After removal of unbound virions by washing with PBS, cells were fixed in methanol for 10 min at -20°C and processed for IF analysis of HS moieties unmasked by the treatment with heparinases (3G10 monoclonal antibody) and of HCV core (C7-50 monoclonal antibody). Control cells were not digested by heparinases.

4.12 | Immunoprecipitation of Synd-1 and CD81. CD81 detection

PHHs and Huh7.5 cell pellets were frozen at -80 °C. After thawing, they were lysed in a buffer containing 1% Brij97, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and proteases inhibitors and kept on ice for 30 min. Lysates were centrifuged 20 min at 8,000g and 4 °C. Five hundred microliters of each supernatant was incubated with antibodies against Synd-1 (DL101 and H-174; 2 \times 2.5 μ g), CD81 (TS81), or flotillin-1 (5 μ g each). Flotillin-1 is used as a membrane-associated control protein. After 8 hr of incubation at 4 °C on a wheel, 40 μ l of protein A/G Sepharose beads was added, and incubation was prolonged for 16 hr. Beads were washed five times in lysis buffer and resuspended in nonreduced Laemmli buffer (Horváth et al., 1998). Samples were loaded on 4–15% polyacrylamide gradient gels (Biorad), and proteins transferred on PVDF membranes were blotted with monoclonal anti-CD81 (TS81).

4.13 | Synd-1 detection

Huh7.5 cell pellets were frozen at -80°C . After thawing, they were lysed in a buffer containing 1% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and proteases inhibitor cocktail (Roche). Cells were then left on ice for 1 hr. Lysates were then centrifuged at 8,000g for 20 min at 4°C , and 500 μl of each supernatant was incubated with antibodies to: Synd-1 (DL101 and H-174 ; $2 \times 2.5 \mu\text{g}$), CD81 (TS81), flotillin-1, HCV core (C7-50), or Synd-4 (5G9). After an overnight incubation at 4°C on a wheel, 50 μl of protein A/G Sepharose beads was added, and incubation was prolonged for 6 hr. Beads were then washed five times in lysis buffer and resuspended in Laemmli buffer under reduced conditions. Samples were loaded on 10% polyacrylamide gels, and proteins transferred on PVDF membranes were subsequently blotted with monoclonal anti-Synd-1 (DL101).

4.14 | In situ PLA

PHHs were seeded on collagen-coated coverslips placed in six-well plates. Two days later, they were infected with JFH-1-HCV (MOI 0.1) and maintained in supplemented William's E medium (Pichard et al., 2006). After 4 days, cells fixed 10 min in ice-cold methanol or acetone (1:1) were processed according to Duolink® manufacturer's protocol. Primary antibodies were human anti-HCV serum (Hospices Civils de Lyon, Ethics Committee agreement #2010-008-2), rabbit anti-Synd-1 H-174 (1:200), and mouse anti-CD81 TS81 (1:800).

4.15 | Statistical analyses

Data are means \pm standard deviation of three independent experiments in triplicates, unless otherwise stated. All data were analyzed by analysis of variance and Tukey's post-hoc t test. Differences were considered significant when $p < .05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. Lortat-Jacob for expert suggestions on Xylosyltransferases, C.M. Rice for Huh7.5 cells, and the IPS-RFP-NLS reporter system, C. Vanbelle and A. Bouchardon for expert assistance on optical imaging, L. Lefrançois and J. Lucifora for isolation of PHH, and M. Rivoire for access to liver resections. J-L. Darlix and G. Randall are kindly acknowledged for their critical reading of the manuscript.

EIP is supported by FINOVI foundation and ANRS. FR is supported by FINOVI foundation. RM is a recipient of a Ph.D. grant from the "Ligue Nationale contre le Cancer". JB and ER held doctoral fellowships from la "Région Rhône Alpes", ARC 1 Santé.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., & André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*, 19, 95–103.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F.-L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 633–642.
- Bishop, J. R., Schuksz, M., & Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446, 1030–1037.
- Blaising, J., Lévy, P.-L., Gondeau, C., Phelip, C., Varbanov, M., Teissier, E., ... Pécheur, E. I. (2013). Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cellular Microbiology* 15: 1866–1882.
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224, 213–232.
- Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T., & Kräusslich, H.-G. (2006). The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2641–2646.
- Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R., & Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathogens*, 5, e1000702.
- David, G., Bai, X. M., Van der Schueren, B., Cassiman, J. J., & Van den Berghe, H. (1992). Developmental changes in heparan sulfate expression: In situ detection with mAbs. *The Journal of Cell Biology*, 119, 961–975.
- Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Straus, A. H. (1983). Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111, 865–871.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300, C723–C742.
- Esko, J. D., & Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 169–173.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., ... Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446, 801–805.
- Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., McKeating, J. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *Journal of Virology*, 86, 4305–4316.
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science*, 122, 1713–1721.
- Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., ... McKeating, J. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 21092–21102.
- Hayashida, K., Stahl, P. D., & Park, P. W. (2008). Syndecan-1 ectodomain shedding is regulated by the small GTPase Rab5. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 35435–35444.
- Horváth, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (1998). CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 30537–30543.
- Jammart, B., Michelet, M., Pécheur, E.-I., Parent, R., Bartosch, B., Zoulim, F., & Durantel, D. (2013). Very-low-density lipoprotein (VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipoviroparticles than VLDL-deficient Huh7.5 cells. *Journal of Virology*, 87, 5065–5080.
- Jones, C. T., Catanese, M. T., Law, L. M. J., Khetani, S. R., Syder, A. J., Ploss, A., ... Rice, C. M. (2010). Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nature Biotechnology*, 28, 167–171.
- Komurian-Pradel, F., Paranhos-Baccalà, G., Sodoyer, M., Chevallier, P., Mandrand, B., Lotteau, V., & André, P. (2001). Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *Journal of Virological Methods*, 95, 111–119.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., & Pietschmann, T. (2007). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *Journal of Virology*, 81, 588–598.

- Lamas Longarela, O., Schmidt, T. T., Schöneweis, K., Romeo, R., Wedemeyer, H., Urban, S., & Schulze, A. (2013). Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS One*, 8, e58340.
- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S. A., & Zimmermann, P. (2009). The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 662–669.
- Laskus, T., Wang, L. F., Radkowski, M., Vargas, H., Nowicki, M., Wilkinson, J., & Rakela, J. (2001). Exposure of hepatitis C virus (HCV) RNA-positive recipients to HCV RNA-positive blood donors results in rapid predominance of a single donor strain and exclusion and/or suppression of the recipient strain. *Journal of Virology*, 75, 2059–2066.
- Lefèvre, M., Felmlee, D. J., Parnot, M., Baumert, T. F., & Schuster, C. (2014). Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One*, 9, e95550.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., & Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of Virology*, 83, 2011–2014.
- Lyon, M., Deakin, J. A., & Gallagher, J. T. (1994). Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 11208–11215.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169, 375–382.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., ... Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *Journal of Medical Virology*, 79, 714–723.
- Mosier, P. D., Krishnasamy, C., Kellogg, G. E., & Desai, U. R. (2012). On the specificity of heparin/heparan sulfate binding to proteins. Anion-binding sites on antithrombin and thrombin are fundamentally different. *PLoS One*, 7, e48632.
- Pichard, L., Raulet, E., Fabre, G., Ferrini, J. B., Ourlin, J.-C., & Maurel, P. (2006). Human hepatocyte culture. *Methods in Molecular Biology Clifton NJ*, 320, 283–293.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., ... Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., & Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 457, 882–886.
- Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., ... Götting, C. (2007). Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 5201–5206.
- Ramírez, S., Pérez-del-Pulgar, S., Carrión, J. A., Coto-Llerena, M., Mensa, L., Dragun, J., ... Forns, X. (2010). Hepatitis C virus superinfection of liver grafts: A detailed analysis of early exclusion of non-dominant virus strains. *The Journal of General Virology*, 91, 1183–1188.
- Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. M. J., & oude Egbrink, M. G. A. (2007). The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 454, 345–359.
- Reynolds, G. M., Harris, H. J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P. F., ... McKeating, J. (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology Baltimore Md*, 47, 418–427.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., ... Uprichard, S. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*, 18, 281–285.
- Sasisekharan, R., & Venkataraman, G. (2000). Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 626–631.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., ... Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, 21, 5017–5025.
- Schulze, A., Gripon, P., & Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology Baltimore Md*, 46, 1759–1768.
- Shi, Q., Jiang, J., & Luo, G. (2013). Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *Journal of Virology*, 87, 6866–6875.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., ... Landegren, U. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods*, 3, 995–1000.
- Stanford, K. I., Bishop, J. R., Foley, E. M., Gonzales, J. C., Niesman, I. R., Witztum, J. L., & Esko, J. D. (2009). Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 3236–3245.
- Sutton, A., Friand, V., Brulé-Donneger, S., Chaigneau, T., Zioli, M., Sainte-Catherine, O., Charnaux, N. (2007). Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Molecular Cancer Research MCR*, 5, 21–33.
- Toida, T., Yoshida, H., Toyoda, H., Koshiishi, I., Imanari, T., Hileman, R. E., ... Linhardt, R.J. (1997). Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species. *The Biochemical Journal*, 322(Pt 2), 499–506.
- Tscherne, D.M., Evans, M.J., Hahn, T. von, Jones, C.T., Stamatakis, Z., McKeating, J.A., ... Rice, C.M. (2007) Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology* 81: 3693–3703.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., ... Liang, T.J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, 11, 791–796.
- Woods, A., & Couchman, J. R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 578–583.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Grigorov B, Reungoat E, Gentil dit Maurin A, Varbanov M, Blaising J, Michelet M, Manuel R, Parent R, Bartosch B, Zoulim F, Ruggiero F, Pécheur E-I. Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx. *Cellular Microbiology*. 2017;e12711. doi: 10.1111/cmi.12711

**Molecular cross-talk between the hepatitis C virus and the connective tissue in liver
fibrogenesis.**

Emma Reungoat ¹, Raffaella Romeo ², Arnolfo Petruzzello ³, Fabien Zoulim ¹, Eve-Isabelle
Pécheur ^{1,*}.

¹, Université Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS 5286, Inserm U1052, Centre de Recherche en
Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon , France;

², Gastroenterology Unit, IRCCS Fondazione Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, University
of Milan, Milan, Italy

³, Virology and Molecular Biology Unit, National Cancer Institute, IRCCS Italia, Fondazione
G.Pascale, Naples, Italy.

* Corresponding author: postal address, UMR Inserm U1052/CNRS5286, CRCL, 151 cours Albert
Thomas, 69424 Lyon cedex 03, France; e-mail address: eve-isabelle.pecheur@inserm.fr

Short title : Chronic hepatitis C and liver fibrogenesis.

Abbreviations: CHC, chronic hepatitis C; CTGF, connective tissue growth factor; DAA, direct acting
antivirals; ECM, extracellular matrix; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV,
hepatitis C virus; HGF, hepatocyte growth factor; HSC(s), hepatic stellate cell(s); HSPG, heparan
sulfate proteoglycan; MMP, matrix metalloprotease; SMA, smooth muscle actin; SVR, sustained
virological response; TGF- β 1 and - β 2, transforming growth factor- β 1 and - β 2; TIMP, Tissue
Inhibitor of MMP.

Conflicts of interest: The authors disclose no conflicts.

Abstract.

Chronic infection by the hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver diseases, predisposing to fibrosis and end-stage complications, the most serious being hepatocellular carcinoma. Fibrotic tissue remodeling can exert a pronounced effect on cancer initiation and growth. Liver fibrosis is characterized by an overly abundant accumulation of components of the hepatic extracellular matrix, such as collagens and elastin, with consequences on the biomechanical and biochemical properties of this microenvironment. This review will provide an update on mechanistic concepts of HCV-related liver fibrogenesis and their clinical relevance. Furthermore the molecular details of the cross-talk during disease progression between hepatocytes and the liver connective tissue (hepatic stellate cells and extracellular matrix), will be dissected.

Keywords : liver fibrosis – chronic hepatitis C – extracellular matrix – hepatocytes - hepatic stellate cells – matrix stiffness

1. Introduction.

A recent report from the International Agency for Research on Cancer states that 15% of new cancer cases in 2012 were attributable to carcinogenic infections [1], caused by oncogenic viruses: human papillomavirus for cervical carcinoma, Epstein-Barr virus for Burkitt's and Hodgkin's lymphomas and nasopharynx carcinoma, hepatitis B and C viruses (HBV and HCV, respectively) for hepatocellular carcinoma (HCC). Of note, 73% of HCC cases are attributable to HBV and HCV [1]. It is the fifth most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer death. Its prognosis is poor, since often, diagnosis occurs late and curative therapy is not available. Over decades, chronic inflammation and oxidative stress induced by causative agents lead to chronic hepatic injury, with excessive wound healing and deposition of connective tissue (fibrosis), disruption of hepatic architecture and function, with proliferation of regenerating hepatocytes (cirrhosis), eventually leading to chromosomal aberrations and malignant transformation of proliferating hepatocytes (HCC) [2]. However, HBV and HCV exhibit different pathogenesis and carcinogenic properties.

Concerning hepatitis C, ≈ 80 million individuals are chronically infected with HCV, and at least 30% will develop liver fibrosis, with subsequent complications of cirrhosis and HCC [3,4]. The introduction of new antivirals directly targeting HCV replication (direct-acting antivirals, DAA) and achieving sustained virological response (SVR) in more than 95% of treated patients raised great hopes of a marked reduction in HCC occurrence and recurrence in patients with history of previous liver cancer treated surgically. However recent clinical observations report somewhat conflicting data [5]. SVR induced by anti-HCV therapies based upon interferon (previous treatment) or upon DAA may result in distinct post-SVR HCC risk [6]. Wider use of DAA has revealed several limitations : emergence of resistant viral strains, poorer response in prior non-responders to interferon-based therapies. HCV leads to irreversible changes in cellular signaling (epigenetic events, imprinting), and recent data tend to indicate that chronic hepatitis C (CHC) durably disrupts the balance of inflammatory mediators, even after HCV clearance [7]. These could underlie carcinogenesis after

viral clearance. For example, a variant in the core protein of HCV genotype 1b is associated with increased HCC incidence post SVR [8]. Thus SVR is a virological cure but is not necessarily translated into a cure from risks of liver disease, particularly for patients with advanced fibrosis.

Contamination with HCV occurs from a breach through the blood circulation, from which the virus is transported to the liver where its target cells are hepatocytes. Virions are composed of 3 structural proteins : the capsid or core protein, that compacts the viral genome, and the envelope glycoproteins E1 and E2 that permit viral entry through recognition of several surface receptors. HCV replication is restricted to the cytoplasm of infected cells, where it engages the endoplasmic reticulum (ER) and lipid droplets. Unlike other carcinogenic viruses, HCV entirely replicates outside the nucleus of hepatocytes, and no latency or persistence factor is synthesized during its life cycle [9]. The deleterious effects of CHC are therefore anticipated to occur through a subtle interplay between viral determinants and the liver microenvironment in which the virus propagates. Studying HCV pathogenesis thus implies the thorough study of cellular and tissular alterations induced throughout chronic infection.

Here we will focus on the fibrosis stage of CHC, and examine the actors of this pathology and their entanglement. Molecular details of the cross-talk between some liver cells and the hepatic extracellular matrix (ECM) will be dissected.

2. Main actors of fibrogenesis during CHC.

Human liver consists of 80% hepatocytes. Other cell types are hepatic stellate cells (HSCs) acting as reservoirs of vitamin A, cholangiocytes delineating bile canaliculi, endothelial cells forming liver capillary sinusoids, and liver-resident macrophages (Kupffer cells). We will only focus on hepatocytes and HSCs, since they both produce components of the hepatic ECM, and hepatocytes are the targets of HCV infection. Nutrients, molecules from the hepatic microenvironment and substances to be transported to the bile arrive from sinusoid capillaries, forming a fenestrated endothelium. The region between blood capillary sinusoids and hepatocytes is the space of Disse, containing HSCs and

filled by the hepatic ECM. This space, part of the liver connective tissue [10], is a zone of active exchange between blood and hepatocytes.

In normal liver, HSCs are quiescent, and exhibit a spindle-like shape; their most characteristic feature is the storage of retinoids in intracellular droplets [11]. HSCs also play a major role in liver development and regeneration, by expressing and secreting hepatocyte mitogens such as hepatocyte growth factor (HGF) or epidermal growth factor (EGF) [11]. In injured liver, HSCs become activated, with a continuum of changes in gene expression during activation. They differentiate into myofibroblast-like cells expressing α -smooth muscle actin (α -SMA) [12]. Loss of retinoids and lipid droplets is concomitant to a *de novo* expression of receptors of fibrogenic and chemotactic factors. Activated HSCs also produce ECM components, such as collagen I fibrils that cross-link and deposit in the space of Disse, and secrete in abundance matrix metalloproteases (MMPs) and their inhibitors TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs).

The hepatic ECM, although forming a very limited compartment of low density within the normal liver [13], is of major importance in liver physiology through its scaffolding effect and its roles in biological functions such as cell proliferation, migration and differentiation. It is composed of: (i) collagens, of which those forming an insoluble fibrillar scaffold through the cross-linking of collagen fibrils by lysyl oxidases (LOX) [14,15]; (ii) adhesive glycoproteins such as laminins, tenascins and fibronectin; (iii) glycosaminoglycans (GAG); (iv) proteoglycans, the “space fillers” of the ECM, formed by a ‘core’ protein onto which several GAG chains are covalently-attached (heparin, heparan-, dermatan-, keratan- and chondroitin-sulfate) [16], and (v) hyaluronic acid, a non-sulfated GAG not attached to a core protein [17]. In normal liver, collagens I, III, IV, and V are predominant, and fibronectin is a main component of the space of Disse [18]. Low amounts of elastin are also present in normal liver connective tissue, increasing in diseased liver [19].

ECM functions are schematically represented in **Figure 1**, and can be roughly divided into physical and biochemical properties. In terms of physical properties, the hepatic ECM plays a role in the anchorage of liver cells to confer cohesion to the epithelium (to establish and maintain cell polarity).

Hepatic ECM is also a physical barrier to migration or conversely can direct this migration, through the organization of collagen fibrils in bundles. Cells are capable to sense the biomechanical properties of hepatic ECM, through mechano-transduction machineries involving the focal adhesion complex and the actin cytoskeleton, and ensuring a continuum for signals to propagate from ECM to nuclear chromatin. In particular, matrix stiffness and fibrillar architecture can be sensed, generating signals translated into changes in cell shape or behaviour [20].

Biochemical properties of the hepatic ECM include:

- its ability to capture and bind to growth factors, cytokines and chemokines, to locally concentrate them at the cell surface, thereby acting as a reservoir of signaling molecules. ECM proteoglycans such as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), embedded in the hepatocyte membrane, can also bind molecules and function as low-affinity co-receptors or as signal presenters for another cell type present in the space of Disse (e.g. HSCs), with an important role in inter-cellular communication;

- its capacity to send to cells signals triggered by bioactive fragments of its protein components such as matrikines and matricryptins [21,22], after their processing by MMPs; these processes are regulated by a finely tuned balance between MMPs and TIMPs.

A tight intricacy also exists between hepatic ECM and cells residing within, with reciprocal interactions contributing to liver homeostasis. Therefore, if any of the physical and biochemical properties of the hepatic ECM is altered, an abnormal behavior of cells of the connective tissue will occur, leading with time to the disruption of liver homeostasis and to functional failure observed in fibrosis and cirrhosis.

3. Liver fibrosis in the pathogenesis of HCV.

3.1. General features. Fibrosis is a reversible exuberant wound healing process in which excessive connective tissue builds up in the organ (reviewed in [23] for the liver). It is a dynamic process triggered by the imbalance between ECM production (fibrogenesis) and degradation

(fibrolysis), during which several cell types are recruited onsite to help “seal off” the injury. Mature scar ECM, composed of cross-linked collagens and elastin, is more resistant to MMPs, and fibrils sequestered in deeper portions of scar become inaccessible to these enzymes [24]. The trigger is a chronic liver injury (**Figure 2**). Fibrosis itself is asymptomatic but can lead to portal hypertension, when the scarring distorts blood flow through the liver, or to cirrhosis when disruption of normal hepatic architecture and liver dysfunction occur. Staging of fibrosis is based on liver biopsy or non-invasive methods measuring liver stiffness (transient elastography). Treatment involves correcting the underlying condition when possible, e.g. administering appropriate antiviral therapies to patients with chronic viral infections. However, spontaneous resolution of liver fibrosis is a slow process dependent upon the degree of fibrosis, and which becomes less reversible at advanced disease stages. Of note, these features are common to all etiologies of liver fibrosis.

3.2. During CHC. Specific clinical signs include the gathering of mononuclear cells at the hepatic lobules, an indication of major inflammatory activity not observed in alcohol-related liver fibrosis [25]. Concomitantly, prominent aggregates of lymphocytes are observed in portal zones [25], as reported in the recently developed rat model of hepatitis C-like virus [26]. Necro-inflammation is more commonly observed in CHC than in chronic hepatitis B [27], as are bile duct damages [28]. Vesicular steatosis is present in hepatocytes, prominently in those infected by the virus [26], as a result of HCV-mediated metabolic reprogramming. Moreover, CHC causes major changes in the inflammatory cytokine and chemokine milieu, susceptible to be translated into specific disease manifestations [29].

HCV leaves the circulation through the fenestrae of the sinusoid capillaries, and crosses the space of Disse. Very early in HCV pathogenesis, virions are therefore susceptible of interactions with elements of the connective tissue, HSCs in particular. HCV infection of hepatocytes occurs after recognition at the cell plasma membrane of a quartet of receptors necessary and sufficient for viral entry: the tetraspanin CD81, the scavenger receptor SR-BI, and the components of tight junctions

claudin-1 and occludin [30]. Recently we identified syndecan-1 as a cofactor of CD81 for HCV entry [31]; both molecules form a complex linking the ECM to the cytoskeleton [32] and to integrins, receptors of ECM components [33]. This emphasizes the subtle connection that occurs early between infection, hepatic ECM and key components of the intracellular machinery that could act as sensors of ECM physical properties (stiffness/tension; **Figure 1**).

Persistent HCV infection of hepatocytes induces the activation of the focal adhesion kinase, leading to increased expression of paxillin and delocalization of α -actinin [34], forming the focal adhesion complex [35]. This might translate into modifications of cell adhesion and migration properties, and trigger cytoskeletal reorganizations transduced into signals transiting to the nucleus through mechano-transduction machineries (**Figure 1**). Interestingly the expression of syndecan-1 was down-regulated in chronically-infected hepatocytes [31], in line with observations on biopsies collected from patients with HCC, including HCV-infected patients [36] : the down-regulation was more pronounced in the tumoral tissue than in peripheral non-tumoral zones, and correlated with the aggressiveness of the tumor. It also correlated with the up-regulation of xylosyltransferase-2 [31], a key enzyme located in the ER/Golgi compartments, involved in the biosynthesis of the tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans [37]. Xylosyltransferase-2 activity was found increased in the serum of patients with HCV-related liver fibrosis, positively correlating with the fibrosis stage [38,39], evocative of a dramatic remodeling of proteoglycans within the fibrotic ECM.

3.2.1. Influence of growth factors.

TGF- β . Upon any liver injury in general, and CHC in particular, hepatocytes and neighboring cells in the space of Disse secrete high levels of the Transforming Growth Factors TGF- β 1 and TGF- β 2 [40,41], involved in fibrogenesis [24,42] (**Figure 2**). This secretion contributes to HSC activation and transformation into myofibroblast-like cells [41]. Indeed TGF- β 1-mediated activation of HSCs [43] results in vitamin A loss accompanied by a decrease in serum retinoid levels [44], and in α -SMA

expression [34,45,46]. Increased levels of TGF- β 1 in the serum of CHC patients were reported [47], together with high amounts of TGF- β 1 protein [48] and mRNA in liver specimens. These correlated with the stage of liver disease but not with HCV RNA levels [49,50]. Increased TGF- β 1 production by HCV-infected hepatocytes could result in these cells from the upregulated expression of the glucose-regulated protein 94 (GRP94), an HSP90-like chaperone protein of the ER lumen and an ER stress marker [41]. Overproduction of GRP94 would engage the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway, which in turn would trigger the enhancement of TGF- β 1 production. This whole signaling loop would be orchestrated by interactions of the E2 glycoprotein of HCV with yet unknown cellular partners.

CTGF. Connective Tissue Growth Factor (CTGF) is a mitogen expressed in hepatocytes, HSCs, vascular endothelial cells and cholangiocytes [39], and overexpressed in chronic liver diseases [51]. CTGF binds to sulfated GAGs and HSPGs (**Figure 1**), thereby acting as a local reservoir that can attract competent cells to fibrotic sites. It also plays an autocrine role on HSCs, leading to abundant production of ECM molecules. Elevated serum and liver levels of this cytokine were found in fibrotic patients chronically infected with HCV [51,52]. During chronic exposure to HCV, the over-expression of CTGF is mediated by TGF- β 1 [40,46].

3.2.2 Enzymes and components of the liver ECM. A profibrogenic phenotype is acquired during CHC, with increased expression and release in the connective tissue of collagens I (forming fibrils) and IV (forming networks) [40,46,53], elastin [48], proteoglycans such as fibromodulin [54], lumican (functioning in the assembly of collagen fibrils) [48], and of hyaluronic acid [34]. These overexpressed components contribute to the alterations of the biophysical properties of the hepatic ECM during chronic infection.

Lysyl oxidases. The lysyl oxidase family of enzymes comprises 5 members : LOX and LOX-like 1 to 4 (LOXL). They are copper-dependent secreted amine oxidases that cross-link monomers of collagen or elastin, to form insoluble fibrils. Hepatocytes of healthy livers do not express, or express

only low amounts of lysyl oxidases [55]. In viral hepatitis B or C, LOX and LOXL1 expression is strongly enhanced in activated HSCs but not in hepatocytes [55]. Likewise, collagen deposits are only observed in fibrotic zones, not around hepatocytes, in contrast to what is observed in fibrotic liver diseases of other etiologies. LOXL2 is strongly induced in fibrotic liver, where it localizes to regions of collagenous matrix and to α -SMA-positive fibroblasts-like cells [56]. More specifically, in fibrotic liver diseases related to active hepatitis C infection, LOX and LOXL2 were detected at the fibrotic disease interface composed of fibroblasts, hepatocytes and neovasculature [56]. LOX was found to contribute to collagen stabilization in liver fibrosis, promote fibrogenic activation of HSCs, and limit fibrosis reversal [57]. LOXL2 also mediates fibrotic matrix stabilization, and stimulates hepatocyte progenitor cells differentiation toward fibrogenic cholangiocytes [58]. The fibrosis-promoting activities of LOX and LOXL2 are susceptible to occur even after cessation of a chronic liver injury. Together with the global morphological reorganization of the liver due to ECM accumulation that alters liver metabolism, these impaired enzymatic activities might contribute to the persistence of clinical signs of liver disease after SVR in the case of CHC, in the absence of any therapy targeting the enzymes [56]. This feature may be even more pronounced when alcohol intake and/or metabolic syndrome complicate chronic infection.

Matrix metalloproteases and their inhibitors. The expression of several MMPs is modified during CHC: profibrogenic MMP-2 and MMP-9 are enhanced [40,46,59], while fibrolytic MMP-1 and -13 are down-regulated [40], likely *via* the cytokine IL-13 [53]. Since these latter MMPs are collagenases, their down-regulation will amplify the deposition of insoluble collagen fibers and aggravate the fibrotic phenotype. In parallel, expression and secretion of TIMPs, in particular TIMP-1, are enhanced to compensate for an increased activity of MMPs [40,60]. Under physiological conditions of liver regeneration during wound healing, the normal equilibrium between MMPs and TIMPs is restored, whereas the MMP/TIMP ratio remains imbalanced during fibrosis (**Figure 2**). Elevated levels of MMP-2 and -9 were reported in the serum and/or liver specimens of CHC patients,

correlating with the fibrosis stage [59,61]. The serum level of TIMPs was suggested as an indicator of hepatic fibrosis: increased serum levels of TIMP-1 in CHC patients correlated with the stage of liver fibrosis [62], better than those of TIMP-2 [63].

Collagens and derived fragments. Studies attempting to define etiology-dependent molecular signatures of liver fibrosis identified serological biomarkers that variably evolve during chronic hepatitis B and C. Pro-C3 (N-terminal type III collagen propeptide), a fragment of type III collagen formation, has been proposed as a useful serum biomarker of the prediction of fibrosis progression in patients with CHC [64]. Interestingly, such patients displayed higher serum levels of this biomarker than HBV-chronically infected patients [27]. By contrast, serum of HBV-infected patients had higher levels of the protease-cleaved 7S domain of the amino-terminal propeptide of type IV procollagen P4NP7S, a biomarker of type IV collagen formation. Chronic HBV-infected patients also had higher serum levels of markers of MMP-degraded type III, IV and VI collagens than CHC patients, as a reflection of a greater basement remodeling induced by chronic hepatitis B [27].

Tenascin-C. The expression of this ECM glycoprotein is low in normal adult tissue, but increases during pathological tissue remodeling, such as wound healing, fibrogenesis or tumorigenesis. A chronic liver injury leads to the activation of HSCs, with concomitant enhanced secretion of tenascins, in particular tenascin-C in CHC [65]. Serum tenascin-C has therefore been suggested as a biomarker to discriminate fibrotic/cirrhotic patients with active hepatitis C from those with HCV eradication after antiviral therapy [66]. Tenascin-C serum levels were found to correlate with the stage of liver fibrosis, as an indication of ongoing hepatic insult in fibrotic/cirrhotic patients. After SVR, serum levels of this protein returned to the baseline observed in healthy individuals, suggesting the reversion of HSCs to their quiescent state [66].

Elastin. It is a minor ECM component in normal liver, which nevertheless plays a key role to confer strength and elasticity to the organ. It is cross-linked from tropoelastin by LOX to give rise to insoluble elastin fibers, in a similar reaction as that polymerizing collagen fibrils [15,19]. Elastin fibers are stable components of ECM, although proteolytically processed by MMP-2, -9 and the elastase MMP-12. TGF- β 1-mediated activation of HSCs leads to increased expression of tropoelastin [67]. Increasing amounts of elastin in the hepatic ECM correlated with the severity of liver fibrosis related to CHC [48]. Likewise, a greater size of elastin fibers positively correlates with an increase in liver stiffness [19]. The degree of accumulation of elastin in fibrotic liver can thus be used to diagnose the liver disease and its severity by transient elastography [68]. Elastin processed into small peptide fragments, together with matrikines and matricryptins, acts as chemo-attractant for cells of the immune system that will locally secrete inflammatory cytokines (**Figure 1**). Elastin peptides can also stimulate the proliferation of activated HSCs and their secretion of MMP-12 [19], thereby aggravating the imbalance between MMP and TIMP (**Figure 2**).

4. The peculiar matter of matrix stiffness in liver fibrosis and CHC.

Matrix stiffening is considered as an endpoint of organ fibrosis, now recognized as a critical regulator of tissue fibrogenesis and disease progression. Tissues can be modeled as viscoelastic structures, a subtle equilibrium between an elastic solid and a viscous liquid. ECM rigidity is determined by its chemical composition and structural organization. Tensional integrity, abbreviated as “tensegrity” [69], is a combination of: (i) a baseline stress that maintains the structure (cell, tissue, organ) in normal tension at a fixed rigidity; (ii) mechanical stability, which allows the components of the structure to remain in tension as stress on the structure increases. The theory of “tensegrity” in cell and molecular biology has been put forward by Donald E. Ingber, to explain how cells use tension/rigidity to stabilize their structure, and make the most efficient use of the surrounding space [69]. Two obvious “tensegrity” scaffolds are the cytoskeleton and the ECM. Biomechanical forces are therefore important regulators of cell shape, development and behavior (**Figure 1**). In the ECM, collagen and

elastin molecules will determine the overall tension/stress exerted at baseline (physiological) conditions. Proteoglycans and hyaluronic acid, regulators of matrix hydration, will confer resistance to compression.

4.1. General mechanisms. Increasing stiffness correlates with increased actomyosin contractility, Ca^{2+} influxes and phosphorylation of several proteins; it also correlates with the activation of Rho/Rho-associated protein kinase (ROCK) and ERK pathways [70,71]. The primary bio-mechanosensors are integrins: in response to an increase in matrix stiffness, they are activated, cluster at the cell surface to form focal adhesions, which are dynamic structures linking the actin cytoskeleton to the ECM [72]. These structures convert mechanical cues into biochemical signaling, and promote cell contractility and proliferation signals [70,73].

Mechanical stress can then be either *transduced* or *transmitted* from the ECM to the nucleus. *Mechano-transduction* pathways involve mechano-sensitive channels which, upon Ca^{2+} inflow, modulate target gene expression. Transduction mechanisms can also involve the activation of a kinase or a phosphatase through focal adhesion complexes, such as the focal adhesion kinase FAK. Its activation results in phosphorylation-dependent increased function of proteins such as paxillin and α -actinin, thereby controlling the function of cellular adhesion structures and regulating actomyosin contractility [71]. This will ultimately affect the Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4 α) transcriptional network [74]: within this network, the expression of downstream target genes such as *Baat* (bile acid-coenzyme A:amino acid N-acyltransferase), *F7* (factor VII) and *Gys2* (glycogen synthase 2) is activated, while that of genes such as *Snail* (Snail) and *Vim* (vimentin) is repressed [74]. HNF4 α is a nuclear receptor which regulates metabolism, cell junctions, differentiation and proliferation in liver and intestinal epithelial cells (see below).

Mechanical stress can be directly *transmitted* from the cell surface to the nucleus, leading to changes in nuclear shape and modifications in chromatin organization [75]. Transmission can also be achieved by transcription regulators, i.e. molecular players connecting mechanical stimuli to gene

transcription; two main candidates are the mechanosensitive protein Myocardin-Related Transcription Factor-A (MRTF-A) and the Yes-Associated Protein/Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif (YAP/TAZ) [71]. When changes in matrix stiffness are sensed by integrins, actin polymerization increases and MRTF-A is released from its association to G-actin in the cytoplasm, which allows its migration to the nucleus where it binds to promoters of target genes and initiates transcription. Conversely, transmission through YAP/TAZ requires stress fibers and cytoskeletal tension, but is not directly regulated by G-actin levels [76]. YAP/TAZ appears to directly respond to ECM stiffness and intracellular tension [77], by translocating from the cytoplasm to the nucleus where it binds DNA transcription factors and regulates gene expression.

4.2. ECM stiffness during CHC and related liver fibrosis. Increased matrix stiffness can directly activate HSCs (α -SMA expression), as observed in biomechanical devices [78,79]. In turn, these cells synthesize abundant amounts of collagens I. The cellular response to mechanical alterations is non-linear, i.e. small changes in matrix stiffness result in dramatic changes in cell phenotype [80]. During HCV infection, HSC activation can also result from the engagement of the mechano-transducer FAK. Indeed, infection was found to activate FAK and its partners paxillin and α -actinin in HCV-infected hepatocytes; then HSCs exposed to the conditioned medium from these cells got activated, and secreted higher levels of hyaluronic acid than HSCs exposed to the conditioned medium of uninfected hepatocytes [34]. Interestingly, the conditioned medium of FAK-silenced HCV-infected hepatocytes did not lead to a similar activation. The following pathway was then put forward: HCV infection induces FAK activation, which in turn stimulates the production and secretion of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). This cytokine could then mediate HSC activation [34].

In normal adult liver, HNF4 α is solely expressed by hepatocytes, whereas it is also observed in the nuclei of biliary epithelial cells during severe CHC [81]; this pattern is likely the consequence of chronic hepatocyte damages, and in line with the report that HCV-induced liver disease produces

more bile duct damages than other etiologies [25]. In the liver, the HNF4 α transcriptional network is a hepatocyte-specific pathway of regulation of cellular functions, downstream the general mechano-sensing machineries of transduction of mechanical cues FAK and Rho/ROCK. During liver fibrosis caused by CCl₄ injection in animals, the increase in matrix rigidity sensed by FAK and Rho/ROCK induces the activation of both pathways, which in turn inhibit the expression of genes within the HNF4 α regulatory network [74], leading to hepatocyte functional impairment. This can be reversed by: (i) re-expressing HNF4 α in hepatocytes from diseased livers with immediate functional improvements (partial restoration of serum albumin secretion and cytochrome C activity), or (ii) inhibiting FAK or Rho/ROCK [82]. A similar impairment of the HNF4 α pathway was observed during HCV infection of hepatocytes *in vitro* [83]; however no data are available to date *in vivo*.

The engagement of the mechano-transmitter and transcriptional regulator MRTF-A in liver fibrosis has been investigated *in vivo* with CCl₄-treated mice. Animals knocked out for MRTF-A were resistant to the development of fibrosis, and this mechano-transmitter was found crucial for HSC activation, through epigenetic mechanisms [84]. It remains to be seen whether this pathway is engaged during HCV-induced liver fibrosis as well.

Livers from hepatitis C patients display strong YAP/TAZ nuclear staining of myofibroblastic (HSC) cells located in fibrotic zones, and of perisinusoidal cells in the liver lobules [85], as a hallmark of YAP activation. This leads to the upregulation of transcription of target genes, which induces HSC proliferation [77]. Among the upregulated target genes is *Ctgf* [85]; as already noted above, CTGF levels are augmented in the serum and liver of fibrotic patients chronically infected with HCV [52]. Mechanistically, a double-negative feedback regulation was recently put forward, in the context of hepatocarcinogenesis in an animal tumor model [86]: in normal liver development, where cell proliferation and differentiation are balanced, YAP/TAZ and HNF4 α would bind to the same DNA-binding transcriptional elements, thereby finely tuning their own expression levels and controlling the transcription of target genes. In pathological situations, YAP/TAZ is overexpressed, and mainly localizes in the nucleus, as observed during fibrogenesis; the complex of YAP/TAZ with the DNA-

binding elements would suppress HNF4 α target genes through the down-regulation of HNF4 α . Under such circumstances, cell proliferation is enhanced while differentiation is inhibited. Since alterations of both YAP/TAZ and HNF4 α pathways are observed during HCV-induced liver fibrosis, it is plausible that the above-described mechanism might be valid in the context of CHC, and at an earlier stage than hepatocarcinogenesis.

5. Are HSCs direct targets of HCV infection ?

Studies addressing the capability of HCV to directly interact with HSCs, that could contribute to a direct fibrogenic effect, reported conflicting data. Florimond and coworkers showed that human liver myofibroblasts, isolated from liver specimens, and that the immortalised HSC cell line LX-2 [87] were not infectable by HCV, due to the lack of receptors essential to its recognition and internalization; they also reported that these cells could not support HCV replication [88]. Conversely, Aoudjehane and coworkers showed that human liver myofibroblasts possessed all key receptors necessary and sufficient for HCV entry, and supported HCV infection [89]. Infection was followed by overexpression of α -SMA, collagens I and IV.

These conflicting data might result from the use of different cell lines and of human liver myofibroblasts infected at different passages. Additional studies would be needed to settle this question, and one must keep in mind that human liver myofibroblasts correspond to activated HSCs, which leaves open the question of HCV infection of quiescent HSCs [90]. Nevertheless, the possibility that (quiescent or activated) HSCs might be directly modulated by the virus during liver invasion enlarges our mechanistic perspectives on the progression of the liver disease during chronic infection.

6. Fibrosis reversal in the era of DAA in CHC.

The main angle of attack of hepatitis C-related liver fibrosis is to reduce or eradicate the primary disease, i.e. curing viral infection. With high SVR rates achieved, most patients treated with DAA

have seen their clinical symptoms regress, in particular fibrosis. However, DAA treatment does not fully restore the altered cytokine and chemokine milieu [7], and patients at advanced stages of disease may remain at risk of liver complications. Combining DAA to other antifibrotic strategies may be desirable. Therapies aiming at the stimulation of matrix degradation and the restoration of normal liver stiffness have been developed, in particular the inhibition of LOXL2. The safety, tolerability and potential efficacy of the anti-LOXL2 monoclonal antibody simtuzumab have been recently assessed in a study of three cohorts of patients: chronically infected by HCV, infected by the human immunodeficiency virus (HIV), or co-infected by HCV and HIV (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01707472; and [91]). Although the treatment was well tolerated, no clinical benefit was observed, with no significant changes in fibrosis score before and after therapy. This might be due to a poor accessibility of simtuzumab to the site of fibrosis, linked to the collagenous consistency of the connective tissue. Other strategies under examination in animals might raise hope of novel therapies aimed at fibrosis regression, in addition to SVR in CHC patients (reviewed in [23]). Some strategies target intracellular signaling, to restore it to normal, such as inhibitors of tyrosine kinase receptors, which are signal transducers of several cytokines. Others aim at inhibiting fibrogenesis, by interfering with its main actors, TGF- β 1 and CTGF; inhibitors of the TGF- β 1 pathway could either block circulating cytokine, antagonize its receptors and/or block its activation at the cell surface. The monoclonal antibody against CTGF, FG-3019, is currently under clinical investigation in lung fibrosis for safety and tolerability (NCT01890265), and might be applied to liver fibrosis. Other strategies consist in increasing the apoptosis of activated HSCs, through the inhibition of anti-apoptotic proteins or of transcription factors such as NF- κ B.

7. Conclusion - Perspectives.

Several general mechanisms involved in fibrosis development could contribute to tumorigenesis. Fibrillar collagens deposited during fibrosis stimulate integrins to form focal adhesion on the cell surface, leading to enhanced integrin signaling, cell growth and survival. This is accompanied by

increased cell migration and anti-apoptotic signaling. In the case of hepatocytes, this signaling would promote survival of pre-cancerous cells. Additionally inhibition of HSC apoptosis or promotion of survival of activated HSCs might be mechanisms by which liver disease progresses during CHC [53,92]. Interestingly, TIMP-1, overexpressed during CHC [40,60], also exhibits anti-apoptotic effects on HSCs, in addition to its anti-MMP activity. This would therefore contribute to liver fibrosis by promoting survival of fibrogenic cells, and to chronic inflammation due to sustained HSC activation and long-lasting perturbation of the tissular milieu. Finally molecules such as HGF form a reservoir of pro-growth stimuli propagating in the hepatic ECM. Taken together, these features could constitute bases to neoplastic transformation.

Although currently available antiviral therapies raise hope of eradicating HCV, it appears that curing the infection does not fully restore liver homeostasis. Efforts toward a deeper comprehension of the underlying mechanisms by which hepatic dysfunctions emerge, spread and persist after HCV infection are therefore still needed, in order to elaborate therapies that cure from liver disease in addition to curing from infection.

Acknowledgments.

EI Pécheur thanks Sylvie Ricard-Blum, Birke Bartosch, Boyan Grigorov and Romain Parent for critical reading of the manuscript. ER is the recipient of a doctoral grant from the “Région Rhône Alpes ARC1 Santé”.

Statement of author contributions.

ER and EIP defined the frame of this review, and wrote the manuscript. RR and AP critically read the manuscript, and FZ gave expert opinion on chronic hepatitis C, liver fibrosis and their treatment.

References.

- 1 Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F. and Franceschi, S. (2016) Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **4**, e609-616.
- 2 Mitchell, J. K., Lemon, S. M. and McGivern, D. R. (2015) How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer? *Curr. Opin. Virol.* **14**, 101–108.
- 3 Polaris Observatory HCV Collaborators. (2017) Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 161–176.
- 4 WHO | Hepatitis C. WHO.
- 5 Nault, J.-C. and Colombo, M. (2016) Hepatocellular carcinoma and direct acting antiviral treatments: Controversy after the revolution. *J. Hepatol.* **65**, 663–665.
- 6 Baumert, T. F., Jühling, F., Ono, A. and Hoshida, Y. (2017) Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC Med.* **15**, 52.
- 7 Hengst, J., Falk, C. S., Schlaphoff, V., Deterding, K., Manns, M. P., Cornberg, M. and Wedemeyer, H. (2016) Direct-Acting Antiviral-Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. *J. Infect. Dis.* **214**, 1965–1974.
- 8 Akuta, N., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Sezaki, H., Suzuki, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Saitoh, S., et al. (2011) Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *J. Med. Virol.* **83**, 1016–1022.
- 9 Paul, D., Madan, V. and Bartenschlager, R. (2014) Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* **16**, 569–579.
- 10 Rauterberg, J., Voss, B., Pott, G. and Gerlach, U. (1981) Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. I. Structure, local distribution and metabolism of connective tissue components in the normal liver and changes in chronic liver diseases. *Klin. Wochenschr.* **59**, 767–779.
- 11 Friedman, S. L. (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172.
- 12 De Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D. A. and Schwabe, R. F. (2007) Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* **132**, 1937–1946.
- 13 Lin, X. Z., Horng, M. H., Sun, Y. N., Shiesh, S. C., Chow, N. H. and Guo, X. Z. (1998) Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 75–80.
- 14 Rojkind, M., Giambrone, M. A. and Biempica, L. (1979) Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* **76**, 710–719.
- 15 Kagan, H. M. (1994) Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol. Res. Pract.* **190**, 910–919.
- 16 Iozzo, R. V. and Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **42**, 11–55.
- 17 Schmaus, A., Bauer, J. and Sleeman, J. P. (2014) Sugars in the microenvironment: the sticky problem of HA turnover in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 1059–1079.
- 18 Martinez-Hernandez, A. and Amenta, P. S. (1995) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **9**, 1401–1410.
- 19 Kanta, J. (2016) Elastin in the Liver. *Front. Physiol.* **7**, 491.
- 20 Sun, S., Song, Z., Cotler, S. J. and Cho, M. (2014) Biomechanics and functionality of hepatocytes in liver cirrhosis. *J. Biomech.* **47**, 2205–2210.
- 21 Wells, J. M., Gaggar, A. and Blalock, J. E. (2015) MMP generated matrikines. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **44–46**, 122–129.
- 22 Ricard-Blum, S. and Vallet, S. D. (2017) Fragments generated upon extracellular matrix remodeling: Biological regulators and potential drugs. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*
- 23 Lee, Y. A., Wallace, M. C. and Friedman, S. L. (2015) Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* **64**, 830–841.
- 24 Ricard-Blum, S., Baffet, G. and Théret, N. (2018) Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*
- 25 Ferrell, L. (2000) Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **13**, 679–704.
- 26 Trivedi, S., Murthy, S., Sharma, H., Hartlage, A. S., Kumar, A., Gadi, S., Simmonds, P., Chauhan, L. V., Scheel, T. K. H., Billerbeck, E., et al. (2017) Viral persistence, liver disease and host response in Hepatitis

C-like virus rat model. *Hepatology*. Baltimore, Md.

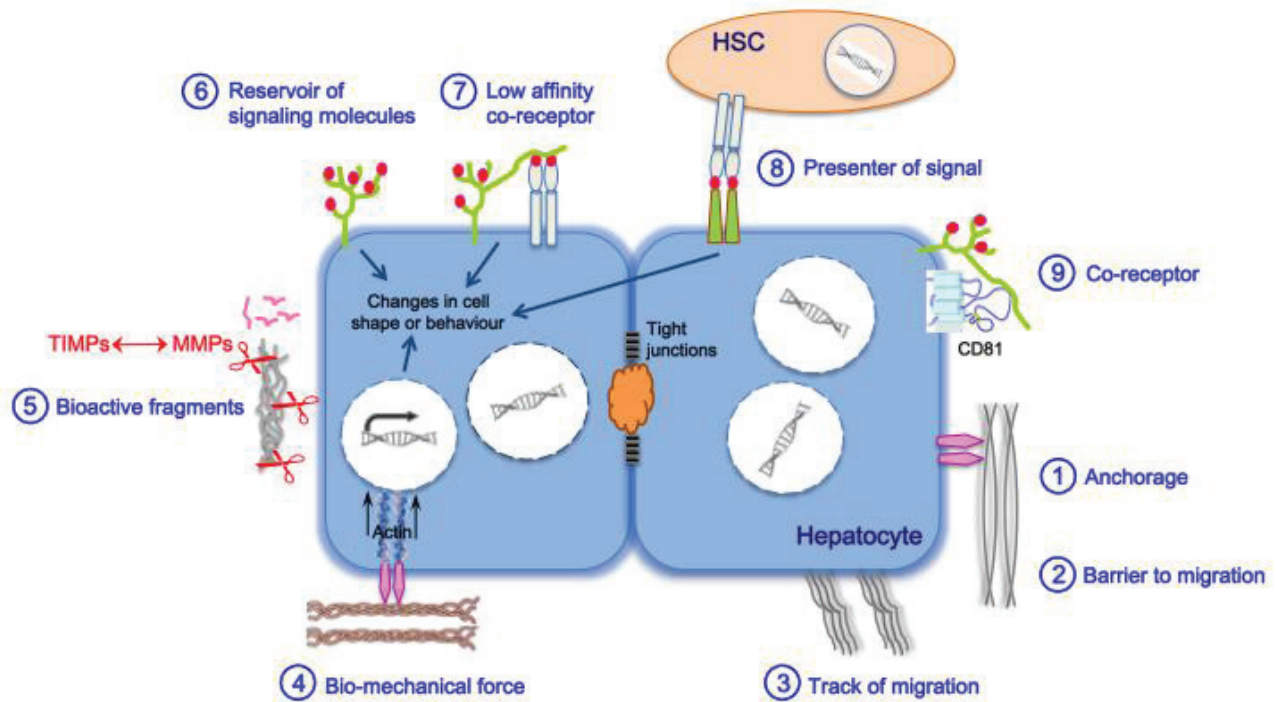
- 27 Nielsen, M. J., Karsdal, M. A., Kazankov, K., Grønbaek, H., Krag, A., Leeming, D. J., Schuppan, D. and George, J. (2016) Fibrosis is not just fibrosis - basement membrane modelling and collagen metabolism differs between hepatitis B- and C-induced injury. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **44**, 1242–1252.
- 28 Guido, M., Mangia, A., Faa, G., Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD) and Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP). (2011) Chronic viral hepatitis: the histology report. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **43 Suppl 4**, S331-343.
- 29 Beltra, J.-C. and Decaluwe, H. (2016) Cytokines and persistent viral infections. *Cytokine* **82**, 4–15.
- 30 Douam, F., Lavillette, D. and Cosset, F.-L. (2015) The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **129**, 63–107.
- 31 Grigorov, B., Reungoat, E., Gentil Dit Maurin, A., Varbanov, M., Blaising, J., Michelet, M., Manuel, R., Parent, R., Bartosch, B., Zoulim, F., et al. (2017) Hepatitis C virus infection propagates through interactions between syndecan-1 and CD81, and impacts the hepatocyte glycocalyx. *Cell. Microbiol.* **19**.
- 32 Hemler, M. E. (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 801–811.
- 33 Berditchevski, F. (2001) Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J. Cell Sci.* **114**, 4143–4151.
- 34 Alisi, A., Arciello, M., Petrini, S., Conti, B., Missale, G. and Balsano, C. (2012) Focal adhesion kinase (FAK) mediates the induction of pro-oncogenic and fibrogenic phenotypes in hepatitis C virus (HCV)-infected cells. *PloS One* **7**, e44147.
- 35 Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J. and Horwitz, A. R. (2005) Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 4917–4919.
- 36 Matsumoto, A., Ono, M., Fujimoto, Y., Gallo, R. L., Bernfield, M. and Kohgo, Y. (1997) Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int. J. Cancer* **74**, 482–491.
- 37 Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K. and Götting, C. (2007) Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **282**, 5201–5206.
- 38 Kuhn, J., Gressner, O. A., Götting, C., Gressner, A. M. and Kleesiek, K. (2009) Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **409**, 123–126.
- 39 Gressner, O. A. and Gao, C. (2014) Monitoring fibrogenic progression in the liver. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **433**, 111–122.
- 40 Schulze-Krebs, A., Preimel, D., Popov, Y., Bartenschlager, R., Lohmann, V., Pinzani, M. and Schuppan, D. (2005) Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **129**, 246–258.
- 41 Jee, M. H., Hong, K. Y., Park, J. H., Lee, J. S., Kim, H. S., Lee, S. H. and Jang, S. K. (2015) New Mechanism of Hepatic Fibrogenesis: Hepatitis C Virus Infection Induces Transforming Growth Factor β 1 Production through Glucose-Regulated Protein 94. *J. Virol.* **90**, 3044–3055.
- 42 Fausto, N., Mead, J. E., Gruppuso, P. A., Castilla, A. and Jakowlew, S. B. (1991) Effects of TGF- β s in the liver: cell proliferation and fibrogenesis. *Ciba Found. Symp.* **157**, 165-174; discussion 174-177.
- 43 Lua, I., Li, Y., Zagory, J. A., Wang, K. S., French, S. W., Sévigny, J. and Asahina, K. (2016) Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J. Hepatology* **64**, 1137–1146.
- 44 Kataria, Y., Deaton, R. J., Enk, E., Jin, M., Petrauskaitė, M., Dong, L., Goldenberg, J. R., Cotler, S. J., Jensen, D. M., van Breemen, R. B., et al. (2016) Retinoid and carotenoid status in serum and liver among patients at high-risk for liver cancer. *BMC Gastroenterol.* **16**, 30.
- 45 Benzoubir, N., Lejamtel, C., Battaglia, S., Testoni, B., Benassi, B., Gondeau, C., Perrin-Cocon, L., Desterke, C., Thiers, V., Samuel, D., et al. (2013) HCV core-mediated activation of latent TGF- β via thrombospondin drives the crosstalk between hepatocytes and stromal environment. *J. Hepatology* **59**, 1160–1168.
- 46 Shin, J. Y., Hur, W., Wang, J. S., Jang, J. W., Kim, C. W., Bae, S. H., Jang, S. K., Yang, S.-H., Sung, Y. C., Kwon, O.-J., et al. (2005) HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF- β 1. *Exp. Mol. Med.* **37**, 138–145.
- 47 Valva, P., Casciato, P., Diaz Carrasco, J. M., Gadano, A., Galdame, O., Galoppo, M. C., Mullen, E., De Matteo, E. and Preciado, M. V. (2011) The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PloS One* **6**, e23218.

- 48 Baiocchi, A., Montaldo, C., Conigliaro, A., Grimaldi, A., Correani, V., Mura, F., Ciccocanti, F., Rotiroli, N., Brenna, A., Montalbano, M., et al. (2016) Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PloS One* **11**, e0151736.
- 49 Castilla, A., Prieto, J. and Fausto, N. (1991) Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N. Engl. J. Med.* **324**, 933–940.
- 50 Nelson, D. R., Gonzalez-Peralta, R. P., Qian, K., Xu, Y., Marousis, C. G., Davis, G. L. and Lau, J. Y. (1997) Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **4**, 29–35.
- 51 Paradis, V., Dargere, D., Vidaud, M., De Gouville, A. C., Huet, S., Martinez, V., Gauthier, J. M., Ba, N., Sobesky, R., Ratziu, V., et al. (1999) Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* **30**, 968–976.
- 52 Hora, C., Negro, F., Leandro, G., Oneta, C. M., Rubbia-Brandt, L., Muellhaupt, B., Helbling, B., Malinverni, R., Gonvers, J.-J., Dufour, J.-F., et al. (2008) Connective tissue growth factor, steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **28**, 370–376.
- 53 Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E. D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., et al. (2014) IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* **60**, 1879–1890.
- 54 Mormone, E., Lu, Y., Ge, X., Fiel, M. I. and Nieto, N. (2012) Fibromodulin, an oxidative stress-sensitive proteoglycan, regulates the fibrogenic response to liver injury in mice. *Gastroenterology* **142**, 612–621.e5.
- 55 Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H. M., Baruch, Y., Izhak, O. B. and Neufeld, G. (2005) Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson’s disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J. Hepatol.* **43**, 499–507.
- 56 Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., et al. (2010) Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* **16**, 1009–1017.
- 57 Liu, S. B., Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Sverdlov, D. Y., Greenstein, A., Smith, V., Schuppan, D. and Popov, Y. (2016) Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 1599–1609.
- 58 Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Vaid, K. A., Liu, S. B., Yoshida, S., Sverdlov, D. Y., Mikels-Vigdal, A., Smith, V., Schuppan, D. and Popov, Y. V. (2017) Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut* **66**, 1697–1708.
- 59 Li, Y., Zhang, Q., Liu, Y., Luo, Z., Kang, L., Qu, J., Liu, W., Xia, X., Liu, Y., Wu, K., et al. (2012) Hepatitis C virus activates Bcl-2 and MMP-2 expression through multiple cellular signaling pathways. *J. Virol.* **86**, 12531–12543.
- 60 Fontana, R. J., Dienstag, J. L., Bonkovsky, H. L., Sterling, R. K., Naishadham, D., Goodman, Z. D., Lok, A. S. F., Wright, E. C., Su, G. L. and HALT-C Trial Group. (2010) Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut* **59**, 1401–1409.
- 61 Núñez, O., Fernández-Martínez, A., Majano, P. L., Apolinario, A., Gómez-Gonzalo, M., Benedicto, I., López-Cabrera, M., Boscá, L., Clemente, G., García-Monzón, C., et al. (2004) Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* **53**, 1665–1672.
- 62 Murawaki, Y., Ikuta, Y., Koda, M. and Kawasaki, H. (1994) Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: relationship to liver histology. *Hepatology* **20**, 780–787.
- 63 Murawaki, Y., Ikuta, Y. and Kawasaki, H. (1999) Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **281**, 109–120.
- 64 Nielsen, M. J., Veidal, S. S., Karsdal, M. A., Ørsnes-Leeming, D. J., Vainer, B., Gardner, S. D., Hamatake, R., Goodman, Z. D., Schuppan, D. and Patel, K. (2015) Plasma Pro-C3 (N-terminal type III collagen propeptide) predicts fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **35**, 429–437.
- 65 El-Karef, A., Kaito, M., Tanaka, H., Ikeda, K., Nishioka, T., Fujita, N., Inada, H., Adachi, Y., Kawada, N., Nakajima, Y., et al. (2007) Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **46**, 664–673.

- 66 Benbow, J. H., Elam, A. D., Bossi, K. L., Massengill, D. L., Brandon-Warner, E., Anderson, W. E., Culberson, C. R., Russo, M. W., deLemos, A. S. and Schrum, L. W. (2018) Analysis of Plasma Tenascin-C in Post-HCV Cirrhosis: A Prospective Study. *Dig. Dis. Sci.*
- 67 Kanta, J., Dooley, S., Delvoux, B., Breuer, S., D'Amico, T. and Gressner, A. M. (2002) Tropoelastin expression is up-regulated during activation of hepatic stellate cells and in the livers of CCl₄-cirrhotic rats. *Liver* **22**, 220–227.
- 68 Seo, Y. S., Kim, M. Y., Kim, S. U., Hyun, B. S., Jang, J. Y., Lee, J. W., Lee, J. I., Suh, S. J., Park, S. Y., Park, H., et al. (2015) Accuracy of transient elastography in assessing liver fibrosis in chronic viral hepatitis: A multicentre, retrospective study. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **35**, 2246–2255.
- 69 Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E. (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124–1127.
- 70 Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241–254.
- 71 Janmey, P. A., Wells, R. G., Assoian, R. K. and McCulloch, C. A. (2013) From tissue mechanics to transcription factors. *Differ. Res. Biol. Divers.* **86**, 112–120.
- 72 Ivaska, J. (2012) Unanchoring integrins in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **14**, 981–983.
- 73 Huang, S. and Ingber, D. E. (2005) Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* **8**, 175–176.
- 74 Desai, S. S., Tung, J. C., Zhou, V. X., Grenert, J. P., Malato, Y., Rezvani, M., Español-Suñer, R., Willenbring, H., Weaver, V. M. and Chang, T. T. (2016) Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology* **64**, 261–275.
- 75 Martins, R. P., Finan, J. D., Guilak, F. and Lee, D. A. (2012) Mechanical regulation of nuclear structure and function. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14**, 431–455.
- 76 Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183.
- 77 Dupont, S. (2016) Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signaling and mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* **343**, 42–53.
- 78 Olsen, A. L., Bloomer, S. A., Chan, E. P., Gaça, M. D. A., Georges, P. C., Sackey, B., Uemura, M., Janmey, P. A. and Wells, R. G. (2011) Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, G110-118.
- 79 Guvendiren, M., Perepelyuk, M., Wells, R. G. and Burdick, J. A. (2014) Hydrogels with differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **38**, 198–208.
- 80 Wells, R. G. (2008) The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* **47**, 1394–1400.
- 81 Limaye, P. B., Alarcón, G., Walls, A. L., Nalesnik, M. A., Michalopoulos, G. K., Demetris, A. J. and Ochoa, E. R. (2008) Expression of specific hepatocyte and cholangiocyte transcription factors in human liver disease and embryonic development. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **88**, 865–872.
- 82 Nishikawa, T., Bell, A., Brooks, J. M., Setoyama, K., Melis, M., Han, B., Fukumitsu, K., Handa, K., Tian, J., Kaestner, K. H., et al. (2015) Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J. Clin. Invest.* **125**, 1533.
- 83 Vallianou, I., Dafou, D., Vassilaki, N., Mavromara, P. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (2016) Hepatitis C virus suppresses Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha, a key regulator of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **78**, 315–326.
- 84 Tian, W., Hao, C., Fan, Z., Weng, X., Qin, H., Wu, X., Fang, M., Chen, Q., Shen, A. and Xu, Y. (2015) Myocardin related transcription factor A programs epigenetic activation of hepatic stellate cells. *J. Hepatology* **62**, 165–174.
- 85 Mannaerts, I., Leite, S. B., Verhulst, S., Claerhout, S., Eysackers, N., Thoen, L. F. R., Hoorens, A., Reynaert, H., Halder, G. and van Grunsven, L. A. (2015) The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J. Hepatology* **63**, 679–688.
- 86 Cai, W.-Y., Lin, L.-Y., Hao, H., Zhang, S.-M., Ma, F., Hong, X.-X., Zhang, H., Liu, Q.-F., Ye, G.-D., Sun, G.-B., et al. (2017) Yes-associated protein/TEA domain family member and hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4 α) repress reciprocally to regulate hepatocarcinogenesis in rats and mice. *Hepatology* **65**, 1206–1221.
- 87 Xu, L., Hui, A. Y., Albanis, E., Arthur, M. J., O'Byrne, S. M., Blaner, W. S., Mukherjee, P., Friedman,

- S. L. and Eng, F. J. (2005) Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **54**, 142–151.
- 88 Florimond, A., Chouteau, P., Bruscella, P., Le Seyec, J., Mérour, E., Ahnou, N., Mallat, A., Lotersztajn, S. and Pawlotsky, J.-M. (2015) Human hepatic stellate cells are not permissive for hepatitis C virus entry and replication. *Gut* **64**, 957–965.
- 89 Aoudjehane, L., Bisch, G., Scatton, O., Granier, C., Gaston, J., Housset, C., Roingard, P., Cosset, F.-L., Perdigo, F., Balladur, P., et al. (2015) Infection of Human Liver Myofibroblasts by Hepatitis C Virus: A Direct Mechanism of Liver Fibrosis in Hepatitis C. *PLoS One* **10**, e0134141.
- 90 Bartosch, B. (2015) Piecing together the key players of fibrosis in chronic hepatitis C: what roles do non-hepatic liver resident cell types play? *Gut* **64**, 862–863.
- 91 Meissner, E. G., McLaughlin, M., Matthews, L., Gharib, A. M., Wood, B. J., Levy, E., Sinkus, R., Virtaneva, K., Sturdevant, D., Martens, C., et al. (2016) Simtuzumab treatment of advanced liver fibrosis in HIV and HCV-infected adults: results of a 6-month open-label safety trial. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **36**, 1783–1792.
- 92 Gonzalez, S. A., Fiel, M. I., Sauk, J., Cancis, P. W., Liu, R.-C., Chiriboga, L., Yee, H. T., Jacobson, I. M. and Talal, A. H. (2009) Inverse association between hepatic stellate cell apoptosis and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* **16**, 141–148.
- 93 Lu, P., Weaver, V. M. and Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406.
- 94 Wynn, T. A. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524–529.

Figures



Adapted from [93]

Figure 1. Mechanisms of ECM functions. Biological functions of ECM are related to its biochemical and bio-mechanical properties. ① Anchorage to the basement membrane is essential for various processes, such as maintenance of polarity, cell proliferation and differentiation. ② ③ ECM may also serve to block or guide cell migration. ④ Cells are able to sense the biomechanical properties of the ECM (e.g. stiffness), and change their shape or behaviour through mechano-transduction pathways: tensional forces, focused within focal adhesion structures, induce clustering of integrin receptors, which causes recruitment of signaling proteins such as talin, vimentin, paxillin, tensin in direct connection with actin cytoskeletal filaments and microtubules. Several kinases also concentrated at the focal adhesion transfer stimuli from the ECM to intracellular signaling cascades; all these events will ultimately contribute to genome transcription and protein translation. ⑤ ECM directs signals to the cell through bioactive fragments after their processing by proteases such as

MMPs, regulated by TIMPs. ⑥ ECM acts as a reservoir of signaling molecules, by binding and locally concentrating growth factors, cytokines, hormones. Some ECM components such as HSPGs can selectively bind to different growth factors and function as low affinity co-receptors ⑦ or as presenters of signals between hepatocytes and HSCs ⑧, thereby playing a major role in cell–cell communication. ⑨ We demonstrated that the HSPG syndecan-1 and the tetraspanin CD81 interact together; this interaction tightly links ECM, the tetraspanin web and likely the cytoskeleton, and could have functional consequences on both cell behaviour and ECM remodeling. Syndecan-1/CD81 form a co-receptor complex for HCV entry [31]. Scheme adapted from [93].

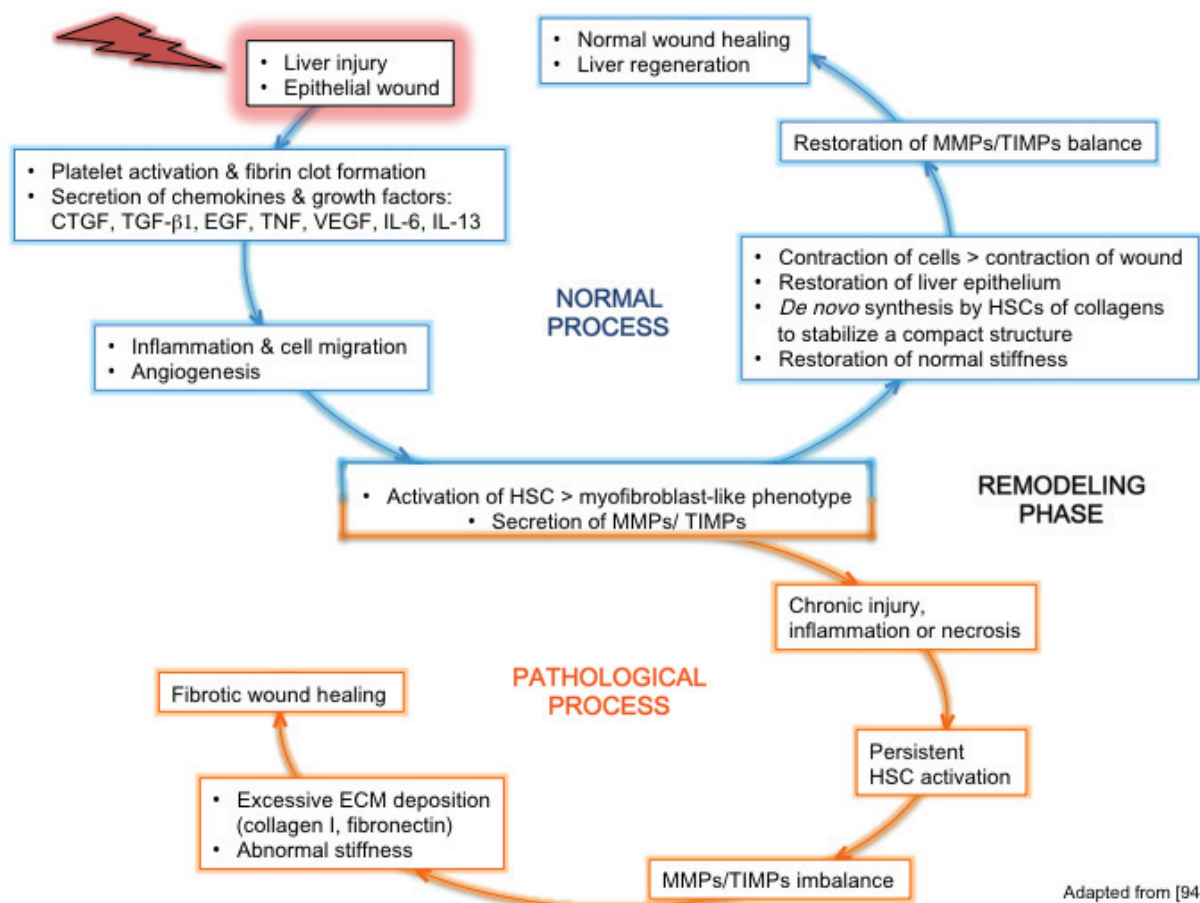


Figure 2. Normal or pathological process after liver injury : tissue regeneration or fibrosis.

After the initial event of liver injury, the epithelial wound accompanied by a breach in the endothelium triggers the coagulation cascade, followed by an inflammatory and proliferation phase mediated by the secretion of inflammatory cytokines and growth factors. The profibrotic cytokines

IL-13 and TGF- β 1 are secreted by activated leukocytes coming from the blood circulation and by sinusoidal cells [19]. Concomitantly, HSCs are activated, thereby adopting a myofibroblast-like phenotype and secreting MMPs and TIMPs. These proteins contribute to the ECM remodeling, together with cytokines and chemokines that recruit leukocytes at the site of injury and activate them. In the loop of a normal wound healing process (**blue**), the inflammatory process gives way to a progressive tissue repair, with the cleaning up of tissue debris and dead cells by leukocytes, the contraction of epithelial cells to restore a normal epithelium and the *de novo* synthesis by HSCs of ECM components that organize in order to stabilize a compact structure between and around cells. This helps to restore a normal stiffness. In parallel, endothelial cells form new blood vessels. The balance of secretion and activity between MMPs and TIMPs is restored to normal. All these features lead to a normal wound healing and liver regeneration. In the loop of a pathological/fibrotic wound healing process (**orange**), a state of chronic injury and inflammation is maintained, accompanied by tissue necrosis instead of repair. This leads to persistent activation of HSCs. Thereby the tight balance between MMPs and TIMPs secretion and activity is disrupted, overly abundant amounts of ECM components produced by activated HSCs are deposited in the interstitial tissue, which becomes scar tissue with abnormal stiffness. Within this stiffer tissue, migration of cells and chemokines that could contribute to healing is greatly impaired. Altogether, these features contribute to a fibrotic wound healing phenotype, with the formation of a permanent fibrotic scar. Scheme adapted from [94].

TGF- β 1 independent xylosyltransferase-induction after an UDP induced repression of the
extracellular matrix in normal human dermal fibroblasts

Bastian Fischer¹, Thanh-Diep Ly¹, Doris Hendig¹, Joachim Kuhn¹, Eve-Isabelle Pécheur²,
Emma Reungoat², Cornelius Knabbe¹, Isabel Faust^{1*}

¹ Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Georgstrasse 11, 32545 Bad Oeynhausen, Germany

² UMR INSERM 1052 / CNRS 5286, Lyon, France

*corresponding author. E-mail address: ifaust@hdz-nrw.de

Highlights

- UDP-treatment of NHDF leads to increased intracellular XT-activity
- Pseudo-fibrotic XT induction is independent of TGF- β 1
- UDP-treatment results in decreased gene expression levels of ECM-associated targets
- *UXS1*-knockdown results in increased XT-activity and *XYLT1*-expression
- Anti-fibrotic UDP-treatment must be complemented by XT inhibition

Abstract

Fibrosis is a common disease, which affects many people worldwide. During the manifestation of the disease, an accumulation of different extracellular matrix (ECM) molecules, such as proteoglycans, takes place. Until today, there is no appropriate therapeutic option available, to heal fibrosis. Current research primary focuses on targets such as the cytokine transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), which is assumed to be one of the key mediators of fibrosis.

Both xylosyltransferase isoforms, XT-I and XT-II, catalyse the rate limiting step of the proteoglycan biosynthesis. For this reason, inhibiting XT activity could be a promising approach to treat fibrosis. In earlier studies, it was shown that different nucleotides and nucleosides have anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. Here, we evaluated the capability of inhibiting XT-activity by the nucleotide uridine diphosphate (UDP).

Our data show for the first time that treatment of normal human dermal fibroblasts with UDP results in an anti-fibrotic decrease of extracellular XT-activity and a diminished expression of ECM molecules, while intracellular XT-activity is increased. This pseudo-fibrotic XT increasement is independent of TGF- β 1 and could be attributed to a compensation of decreased UDP-glucuronate decarboxylase 1 (*UXS1*) mRNA expression. In summary, our results describe a so far undescribed XT inductive pathway and show, that UDP could be a promising molecule for the development of an anti-fibrotic therapy. Nevertheless, XT-activity has to be inhibited in parallel intracellularly.

Keywords

Xylosyltransferase, fibrosis, proteoglycans, extracellular matrix, uridine-diphosphate

Abbreviations

ECM: extracellular matrix

NHDF: normal human dermal fibroblasts

PG: proteoglycans

UDP: uridine-diphosphate

XT: xylosyltransferase

Introduction

A fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) molecules in organs and tissues, which can lead to a functional- and architectural loss. Therefore, different connective tissue diseases are associated with fibrosis [1]. Although fibrotic diseases represent a major cause of mortality and morbidity worldwide, there is no appropriate therapeutic approach. Finding such a therapeutic option requires a better understanding of the involved mechanisms.

It is known that the cytokine transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is the key mediator of fibrosis, which initiates the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts [2]. When activated, myofibroblasts synthesize increased levels of different ECM-molecules such as collagens and alpha-smooth muscle actin (ACTA2). Therefore, myofibroblast persistence supports fibrotic remodelling.

This leads to an alteration of the molecular composition within the ECM, which is a three-dimensional structure found within all tissues. The molecules, the ECM is composed of, are secreted by the surrounding cells, as for instance fibroblasts [3]. The ECM not only gives biological stability, but also initiates biochemical signalling, which is indispensable with regard to tissue differentiation, morphogenesis and homeostasis [4]. Beside collagens, elastin and others, proteoglycans (PG) are the most common molecules within the ECM, which accumulate during the manifestation of fibrotic diseases.

The key enzyme of PG biosynthesis is xylosyltransferase (XT), of which two isoforms (XT-I and XT-II) exist in all higher organisms. In the Golgi apparatus, the XT catalyses the rate limiting step of the PG-biosynthesis by transferring activated xylose from uridine diphosphate (UDP)-xylose to a serin residue of an acceptor protein. After xylosylation, XT is cleaved from the surface of the Golgi and is secreted into the extracellular space in its active form. Therefore, secreted serum XT leads as a biomarker of different fibrotic diseases, as for instance skin fibrosis [5, 6]. TGF- β 1 induced XT activity is also associated with an increased

myofibroblast differentiation. Due to this, XT is additionally a marker for myofibroblast-differentiation [7].

So, to decrease PG deposition within the ECM, it could be a promising approach to specifically inhibit XT-activity during fibrosis. In 2008, Casanova et al. tested the capability of different nucleotides to inhibit the XT-activity in a cell-free system. They showed that the nucleotide UDP was able to strongly inhibit the XT-activity within this system in a concentration dependent manner [8]. Here, we examined if these findings are reproducible using our cell-culture model.

Materials and methods

Materials

UDP disodium salt hydrate and cell proliferation reagent water soluble tetrazolium (WST-1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). siRNAs were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Cell culture

Normal human dermal fibroblasts (NHDF, 5th to 7th passage) of three healthy controls were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (ThermoFisher, Waltham, USA) supplemented with 10 % fetal calve serum (PAN, Aidenbach, GER), 2 % L-glutamin and 1 % antibiotic/antimycotic solution (100x; PAA, Pasching, AT) at 5 % CO₂ and 37 °C. For nucleotide treatment, 2.3×10^5 cells were seeded in a 100x22 mm cell culture dish. After 24 h, cells were treated with 1 mg/mL UDP. Another 48 h later, cells were harvested to isolate RNA.

siRNA-knockdown was performed in 60x50 mm cell culture dishes (3×10^5 cells/dish). 24 h after seeding, cells were transfected with either a siRNA targeting the *UXS1* gene product or a control siRNA, which does not target any human mRNA (final concentration: 40 nM). For transfection, we used Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). 48 h after transfection, cells were harvested to isolate RNA.

All measurements were performed in triplicate. Lysates were resuspended in buffer RA1 (Macherey-Nagel, Düren, GER) and stored at -80 °C. Cell culture supernatants were stored at -20 °C.

Nucleic acid extraction and reverse transcription

According to the manufacturer's instructions, RNA Spin Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren, GER) was used to isolate total RNA. For DNA normalization, 50 µL of cell lysate were collected after the first purification step. DNA purification was performed using the DNA Spin Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren, GER). Concentrations and purities of nucleic acids were

measured by using the NanoDrop 2000 (Peqlab, Erlangen, GER). For cDNA synthesis, 1 µg RNA was reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher, Waltham, USA).

Quantitative realtime-PCR

To determine the mRNA expression levels of different ECM-associated genes, we performed a realtime-PCR. A LightCycler 480 II instrument (Roche, Basel, CHE) was used for amplification. One reaction mixture contained 2.5 µL of cDNA (1:10 dilution), 5 µL of a SYBR green based Taq-DNA polymerase mix (Roche, Basel, CHE), 0.25 µL of each primer (forward and reverse, each 25 pmol/µL) and 2 µL water. For each amplification, we used the following program: 95 °C for 5 min, 45 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing for 15 s (specific annealing-temperatures were previously determined for each primer-pair, Supplement Tab.1) and an elongation step at 72 °C for 20 s. Finally, a melting curve analysis was performed. Relative transcription levels were determined in triplicate and calculated by the delta-delta Ct-method. Normalization factor calculation was based on the geometric mean of the expression levels of *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* and *β2-microglobulin (B2M)*.

Radiochemical xylosyltransferase activity assay

To determine XT activity in cell culture supernatants and lysates, we used a radiochemical assay previously described [6]. Measurements (counts per minute) were performed in duplicates. Results were normalized to the DNA concentration of the related cell lysate. For lysis (intracellular XT-activity), cell pellet was resuspended in a Nonidet P-40 (NP-40) based buffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, pH 7.8). After centrifugation (10.000xg, 10 min, 4 °C), supernatant was stored at -20 °C until use.

Cell proliferation assay

To determine the proliferation capability and viability of nucleotide treated NHDF, we performed a cell proliferation assay based on the enzymatic conversion of WST-1 to

formazan. This conversion only occurs in viable cells and can be measured photometrically. For this, 1.700 cells were seeded into a cavity of a 96 well plate. 24 h after seeding, medium was supplemented with 1 mg/mL UDP (100 μ L final volume/cavity). After this, cells were cultivated for an additional time of 44 h. The experiment was started by adding 10 μ L WST-1 to each cavity. Absorption was measured at different time points within 4 h at 450 nm.

UDP-xylose assay

To determine intracellular xylose-concentrations, NHDF were cultivated in 12-well plates and lysed in CHAPS buffer (1 % CHAPS, 1 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 25 mM Hepes). Following this, lysates were additionally sonicated (Biorupter Plus, Diagenode, Liege, Belgium, 10 cycles, 30 s ON/ 15 s OFF). Coloring reagent was prepared in 100 mL of glacial acetic mixed with 0.5 g phloroglucinol and 10 mL fuming hydrochloric acid. To start colorimetric reaction, 50 μ L of cell lysate were mixed with 450 μ L of coloring reagent. The mixture was heated at 100 °C for 4 min and optical density was measured at 554 nm. A xylose scale was prepared in benzoic acid with different concentrations. Xylose concentrations were normalized to protein concentrations in the cell extracts, which were quantified by conducting a BCA assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher, USA).

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (San Diego CA, USA). Data were analyzed using Mann-Whitney U test and are shown as mean \pm SEM, whereby p-values smaller than 0.05 were declared as statistically significant.

Results

Treatment of NHDF with UDP led to reduced extracellular XT-activity

We investigated, if the nucleotide UDP is suitable to inhibit XT-activity in NHDF within our cell culture model. We found that, compared to controls, the extracellular XT-activity, determined in the supernatant of NHDF, was significantly decreased 48 h after treatment of cells with UDP (0.7-fold), whereas the intracellular XT-activity was 1.3-fold increased (Fig.1a). Intra- and extracellular XT-activity were highly significant increased 72 h after incubating NHDF with UDP (2.8- and 1.7-fold, respectively) (Fig.1b).

Usage of UDP resulted in diminished gene expression levels of different enzymes, which are involved in the proteoglycan biosynthesis

The two human XT isoforms XT-I and XT-II initiate the synthesis of PG by adding activated xylose from UDP-xylose to a serin residue of a PG core protein. Compared to controls, *XYLT1* expression was not significantly altered 48 h after UDP treatment, whereas *XYLT2* gene expression was 0.7-fold decreased (Fig.2a, b). Gene expression levels of the following two enzymes involved in synthesizing the tetrasaccharid linker during PG-biosynthesis, beta-1,4-galactosyltransferase 7 (*B4GALT7*) and beta-1,3-galactosyltransferase 6 (*B3GALT6*), were 0.6- and 0.7-fold decreased, respectively (Supplement Fig. 1a, b).

The mRNA expression level of *UDP-glucuronate decarboxylase 1 (UXS1)*, the enzyme which catalyses the formation of UDP-xylose from UDP-glucuronate, was 0.7-fold reduced after UDP-treatment (Fig.2c).

Gene expression levels of different ECM components were reduced after treatment of NHDF with UDP

Treatment of NHDF with UDP resulted in decreased gene expression levels of different ECM components. Compared to controls, mRNA expression levels of all determined PG core proteins were reduced. The strongest reduction was observed for the PG aggrecan (*ACAN*), with a 0.2-fold reduction 48 h after the supplementation of cell culture medium with UDP (Fig.

2d). mRNA expression levels of other PG core proteins, as for instance fibronectin (*FN*), perlecan (*HSPG2*) and decorin (*DCN*), were also diminished (Supplement Fig. 1c-e).

Beside PG, collagens are major components of the ECM. Collagens influence the cell attachment and provide tissues with tensile strength. Compared to controls, collagen type I alpha I chain (*COL1A1*) gene expression was 0.6-fold reduced after UDP treatment (Fig. 2e). Nucleotide treatment also led to significant decreases in *collagen type II alpha I chain* (*COL2A1*)- and elastin (*ELN*) gene expression, which provides elasticity and resilience to the ECM (Supplement Fig. 1f, g). Interestingly, mRNA expression level of 5'-nucleotidase ecto (*CD73*), an enzyme which catalyses the conversion of nucleotides to nucleosides, was 1.4-fold increased, compared to controls (Fig.2f).

Gene expression level of myofibroblast marker α -smooth muscle actin (ACTA2) is highly significant reduced after UDP treatment

The differentiation of fibroblasts to myofibroblasts is one of the key mechanisms during fibrosis, as these cells are responsible for the remodelling of the ECM. A marker of this cell-conversion is the protein α - smooth muscle actin (*ACTA2*), which expression is induced by the cytokine TGF- β 1, which is therefore assumed to be one of the key mediators of fibrosis. Compared to controls, the gene expression levels of *ACTA2* (0.3-fold) and TGF- β 1 (0.6-fold) were both diminished after treatment of NHDF with UDP (Fig. 2g, h).

siRNA-knockdown of UXS1 led to an increased extracellular XT-activity and decreased xylose-concentrations in NHDF

UXS1 catalyzes the decarboxylation of UDP-glucuronic to UDP-xylose, which is the natural substrate of the XT. We carried out an *UXS1* siRNA-knockdown to evaluate, if the observed reduction in *UXS1* mRNA expression after UDP treatment has an influence on XT-activity. We first determined the gene expression level of *UXS1* after conducting the knockdown, to verify the success of it. Compared to controls, gene expression of *UXS1* was 0.03-fold decreased 48 h after conducting the knockdown (Fig. 3a). Interestingly both, *XYLT1* gene expression (1.6-fold) and extracellular XT-activity (1.3-fold) were increased after *UXS1*-

siRNA transfection (Fig. 3b, e). The knockdown had no effect on the gene expression of *XYLT2*, whereas *ACTA2* gene expression level was highly significant reduced (0.3-fold) (Fig. 3 c, d). Tendentially, gene expression levels of further ECM-related targets were also reduced, but, because of high standard errors, not significantly (Supplement Fig. 2a-c). In addition, UDP-xylose concentration was intracellularly 0.7-fold reduced compared to controls (Fig. 3f).

The nucleotide UDP was not toxic to NHDF and did not have an impact on the cell proliferation of these cells

To exclude the possibility that the observed effects arise from toxic effects of UDP on NHDF, we carried out a WST1-assay. Absorption (450 nm) of UDP-treated cells, determined hourly during 44 h and 48 h after nucleotide treatment, was approximately 6 % lower than absorption of untreated cells (Abb. 4). So, treatment of NHDF with UDP had no or only very slightly impacts on cell proliferation and viability.

Discussion

Deficiency or alteration in XT-activity is known to play a role in the manifestation of different diseases by affecting biosynthesis of PG [9, 10]. An increased XT-activity leads to the accumulation of ECM components and, as a consequence, to increased fibrotic remodelling [9, 11]. Regarding this, inhibiting the XT-activity could be a promising therapeutic strategy to treat fibrosis.

In 2007, Casanova et al. tested the ability of different nucleosides and nucleotides to inhibit XT-activity in a cell-free system. Besides others, they used uridine-derived nucleotides because of their similarity to UDP-xylose, which is the natural substrate of XT [8]. Their study revealed that uridine-derived nucleotides could be promising concerning the inhibition of the XT-activity. The usage of UDP resulted in the strongest inhibition of XT activity, even at comparatively low concentrations. Taking up on these results, we examined the effect of the nucleotide UDP on the XT-activity and gene expression levels of different ECM-associated targets within our cell culture system.

Treatment of NHDF with UDP led to decreased extracellular XT-activity after 48 h

Our data show that 48 h after treating NHDF with UDP, extracellular XT-activity was significantly decreased, whereas intracellular activity was increased. Thus, UDP is able to inhibit XT in a cell free system but might exert different effects after getting metabolized intracellular. The *XYLT2* gene expression level was significantly decreased 48 h after UDP-treatment, while *XYLT1* gene expression was not altered compared to controls. Interestingly, intra- and extracellular XT-activity became highly significant increased 72 h after the treatment of NHDF with UDP because of XT secretion out of the cells. Similar effects were observed when treating the cells with 10 mg/mL UMP (data not shown), whereby usage of UDP led to stronger effects, which is in accordance with the results in the cell free system [8]. Because we observed a decrease in the gene expression of *UXS1* after UDP treatment in NHDF, we assumed, that the up-regulation in XT activity could be explained due to a compensatory effect, caused by a lack of substrate. Thus, we hypothesize that an increase in

intracellular UDP content might reduce UDP-xylose synthesis pathway via a negative feedback mechanism. Therefore, we conducted an *UXS1* knockdown to figure out, if this would lead to similar effects. Indeed, the *UXS1* knockdown also led to a highly significant increase of both, extracellular XT-activity and *XYLT1* gene expression level. As expected, xylose-concentrations were decreased after conducting the *UXS1* knockdown. This supports the hypothesis that the observed effects arise from a compensation, initiated by a lack of substrate. Another interesting fact in this context is that the XT-II did not seem to be involved in this compensation, as the *XYLT2* gene expression was not altered after the knockdown compared to controls. So, concerning XT-activity, the effects of UDP treatment and *UXS1* knockdown in NHDF are similar. Gene expression levels of other ECM related targets, such as *ACAN* and *Col1A1*, were tending to be reduced after conducting the *UXS1* knockdown. This is in accordance with earlier studies, which revealed reduced PG levels in zebrafish *uxs1* mutants [12]. Another study revealed that in *uxs1* mutant zebrafish larvae, biosynthesis of chondroitin sulfates (CS) was almost abolished, whereas biosynthesis of heparan sulfates (HS) was only reduced by 50 % [13]. Interestingly, mRNA expression of aggrecan, which is a CS-derived PG, was also almost abolished after UDP treatment of NHDF. As PG have an important impact on ECM-assembly, decreased gene expression levels of ECM-components after *UXS1* knockdown could be explained by the altered PG biosynthesis.

Increased XT-activity independently of TGF- β 1

Previous studies revealed that the treatment of cells with the cytokine TGF- β 1 leads to increased *XYLT1* and *ACTA2* gene expression levels, as well as increased XT-I activity [14].

As opposed to this, our data show for the first time that, despite diminished *TGF- β 1* gene expression level, XT activity increased after UDP treatment and no fibrotic remodelling seemed to occur. In addition, the mRNA expression level of the myofibroblast marker *ACTA2* is also highly significant reduced compared to controls.

Taken together, our results show that, within our cell culture model, UDP is only suitable to inhibit XT-activity extracellularly during the early phase after supplementation.

Supplementation of cell culture medium with UDP led to partially highly significant decreases in gene expression levels of ECM associated targets

Regarding mRNA expression levels of different ECM-associated targets, UDP treatment led to strong anti-fibrotic effects. These are characterized by partially considerable reductions in gene expression levels of ECM related molecules such as *ACAN* and *Col1A1*. A diminished expression level of *B4GalT7* could be explained due to a lack of xylosylated PG core proteins, which this enzyme needs to add galactose from UDP-galactose. Until now, there are no studies, which examine the influence of UDP to ECM-homeostasis. But our data are in accordance with previous studies, in which the nucleoside uridine was used for this purpose. Cicko et. al showed that uridine supplementation decreased fibrosis and inflammation in an animal model of pulmonary fibrosis. In addition, uridine treatment in primary lung fibroblasts led to the inhibition of collagens and TGF- β 1 [15]. Anti-inflammatory effects of uridine were also observed in an animal model of lung inflammation [16].

CD73 mRNA expression is increased after UDP treatment

It is known, that UDP binds to the purinergic receptor P2RY₆, which mediates pro-inflammatory effects in different diseases, such as bronchial asthma [17]. However, we did not observe differences in the gene expression levels of P2RY₆ in NHDF after UDP treatment (data not shown). As opposed to this, we determined an increased gene expression level of CD73, which codes for a plasma membrane protein catalysing the conversion of extracellular nucleotides to membrane permeable nucleosides. Concerning this, it could be hypothesised, that the extracellular nucleotide UDP is converted to the nucleoside uridine by this enzyme, to be able to pass through the plasma membrane. Indeed, previous studies revealed that activation of CD73 led to anti-fibrotic effects. For example, CD73^(-/-) mice showed elevated inflammation and fibrosis as well as increased synthesis of pro-fibrotic mediators in the lung [18]. Another study showed that adenosine, formed by CD73 on T cells, was able to inhibit cardiac fibrosis and inflammation [19]. In both studies, not uridine, but adenosine was formed by CD73 and was therefore responsible for the observed effects.

Based on our data, extracellular UDP also seems to have an influence on the *CD73* mRNA expression. However, further studies have to be conducted, to understand the exact mechanism of action after UDP supplementation.

To verify, that the effects observed were not through to a possible toxicity of UDP, we conducted a WST-1 assay, which revealed that UDP has only negligible effects on the proliferation of the cells. Therefore, it could be excluded, that the effects observed were due to a possible toxicity of UDP. Previous studies already demonstrated, that oral uridine uptake is well tolerated and safe in humans [20, 21].

In summary, treatment of NHDF with UDP led to increased intracellular XT-activity after both, 48 h and 72 h in a TGF- β 1 independent manner. This pseudo-fibrotic increasement could be due to a compensation of decreased *UXS1* mRNA expression, which was verified by conducting an *UXS1*-knockdown. However, we additionally observed partially strong anti-fibrotic effects characterised by diminished gene expression levels of ECM-related targets. In conclusion, our and previous data show, that uridine and uridine-derived nucleotides could be promising molecules regarding the development of an anti-fibrotic therapy. For this it should be taken into consideration, to inhibit XT-activity in parallel, when using UDP as a therapeutic agent.

Acknowledgement

The authors thank Philip Saunders for his excellent linguistic advice.

Conflict of interest

The authors assure, that they have no conflict of interest with any content of this work.

Literatur

1. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2):199–210. doi:10.1002/path.2277
2. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2016) TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12(6):325–338. doi:10.1038/nrneph.2016.48
3. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 5. doi:10.3389/fphar.2014.00123
4. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123(Pt 24):4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820
5. Pönighaus C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2010) Involvement of a cysteine protease in the secretion process of human xylosyltransferase I. *Glycoconj J* 27(3):359–366. doi:10.1007/s10719-010-9283-4
6. Kuhn J, Prante C, Schön S, Götting C, Kleesiek K (2006) Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 52(12):2243–2249. doi:10.1373/clinchem.2006.071167
7. Faust I, Roch C, Kuhn J, Prante C, Knabbe C, Hendig D (2013) Human xylosyltransferase-I - a new marker for myofibroblast differentiation in skin fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 436(3):449–454. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.125
8. Casanova JC, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2008) Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II. *Biochem Biophys Res Commun* 365(4):678–684. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.206
9. Götting C, Kuhn J, Kleesiek K (2007) Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 64(12):1498–1517. doi:10.1007/s00018-007-7069-z
10. Condac E, Dale GL, Bender-Neal D, Ferencz B, Towner R, Hinsdale ME (2009) Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum. *Glycobiology* 19(8):829–833. doi:10.1093/glycob/cwp058
11. Götting C, Sollberg S, Kuhn J, Weilke C, Huerkamp C, Brinkmann T, Krieg T, Kleesiek K (1999) Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 112(6):919–924. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00590.x
12. Eames BF, Singer A, Smith GA, Wood ZA, Yan Y-L, He X, Polizzi SJ, Catchen JM, Rodriguez-Mari A, Linbo T, Raible DW, Postlethwait JH (2010) UDP xylose synthase 1 is required for morphogenesis and histogenesis of the craniofacial skeleton. *Dev Biol* 341(2):400–415. doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.035
13. Holmborn K, Habicher J, Kasza Z, Eriksson AS, Filipek-Gorniok B, Gopal S, Couchman JR, Ahlberg PE, Wiweger M, Spillmann D, Kreuger J, Ledin J (2012) On the roles and regulation of chondroitin sulfate and heparan sulfate in zebrafish pharyngeal cartilage morphogenesis. *J Biol Chem* 287(40):33905–33916. doi:10.1074/jbc.M112.401646
14. Faust I, Traut P, Nolting F, Petschallies J, Neumann E, Kunisch E, Kuhn J, Knabbe C, Hendig D (2015) Human xylosyltransferases--mediators of arthrofibrosis? New pathomechanistic insights into arthrofibrotic remodeling after knee replacement therapy. *Sci Rep* 5:12537. doi:10.1038/srep12537
15. Cicko S, Grimm M, Ayata K, Beckert J, Meyer A, Hossfeld M, Zissel G, Idzko M, Müller T (2015) Uridine supplementation exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in an animal model of pulmonary fibrosis. *Respir Res* 16:105. doi:10.1186/s12931-015-0264-9
16. Evaldsson C, Rydén I, Uppugunduri S (2007) Anti-inflammatory effects of exogenous uridine in an animal model of lung inflammation. *Int Immunopharmacol* 7(8):1025–1032. doi:10.1016/j.intimp.2007.03.008
17. Vieira RP, Müller T, Grimm M, Gernler V von, Vetter B, Dürk T, Cicko S, Ayata CK, Sorichter S, Robaye B, Zeiser R, Ferrari D, Kirschbaum A, Zissel G, Virchow JC,

- Boeynaems J-M, Idzko M (2011) Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 184(2):215–223. doi:10.1164/rccm.201011-1762OC
18. Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR (2006) Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 176(7):4449–4458
 19. Quast C, Alter C, Ding Z, Borg N, Schrader J (2017) Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure. *Circ Heart Fail* 10(4). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003346
 20. McComsey GA, Walker UA, Budhathoki CB, Su Z, Currier JS, Kosmiski L, Naini LG, Charles S, Medvik K, Aberg JA (2010) Uridine supplementation in the treatment of HIV lipodystrophy: results of ACTG 5229. *AIDS* 24(16):2507–2515. doi:10.1097/QAD.0b013e32833ea9bc
 21. Venhoff N, Lebrecht D, Deveaud C, Beauvoit B, Bonnet J, Müller K, Kirschner J, Venhoff AC, Walker UA (2010) Oral uridine supplementation antagonizes the peripheral neuropathy and encephalopathy induced by antiretroviral nucleoside analogues. *AIDS* 24(3):345–352. doi:10.1097/QAD.0b013e328335cdea

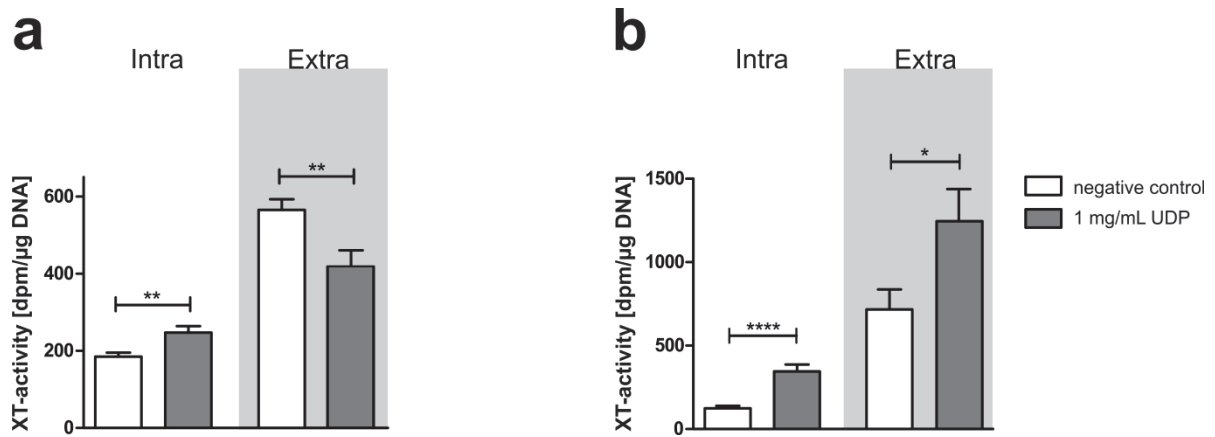


Fig. 1: Intra- and extracellular XT-activity after treating NHDF with UDP. 24 h after seeding of NHDF cell lines (n=3), cell culture medium was supplemented with 1 mg/mL UDP. After an additional time of either 48 h (a) or 72 h (b), XT-activity was determined in the supernatant (extracellular) or in the lysates (intracellular) of the cells. For this, we used a radiochemical XT-assay. Values represent means \pm SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001 (Mann-Whitney U-test).

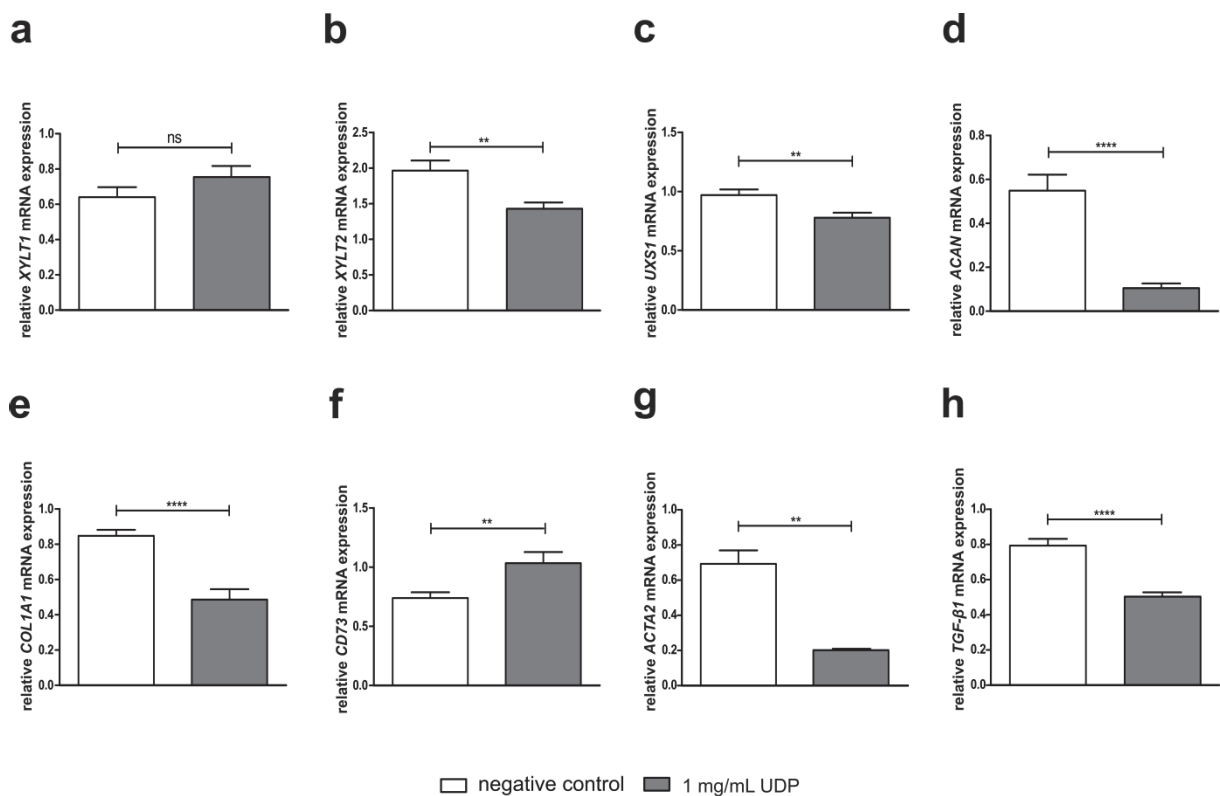


Fig. 2: Relative mRNA expression levels of different ECM-related genes 48 h after treating NHDF with UDP. 24 h after seeding NHDF cell lines (n=3) were treated with 1 mg/mL UDP. After an additional time of 48 h, total RNA was isolated and reverse transcribed. cDNA was used to determine relative mRNA gene expression levels of *XYLT1* (a), *XYLT2* (b), *UXS1* (c), *ACAN* (d), *COL1A1* (e), *CD73* (f), *ACTA2* (g) and *TGF-β1* (h) by realtime-PCR. Data were normalized to a normalization factor, determined by calculating the geometric mean of *HPRT*, *GAPDH* and *B2M* mRNA expression levels, and expressed as a ratio to one cell line. Values represent means \pm SEM. ns: not significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001 (Mann-Whitney U-test).

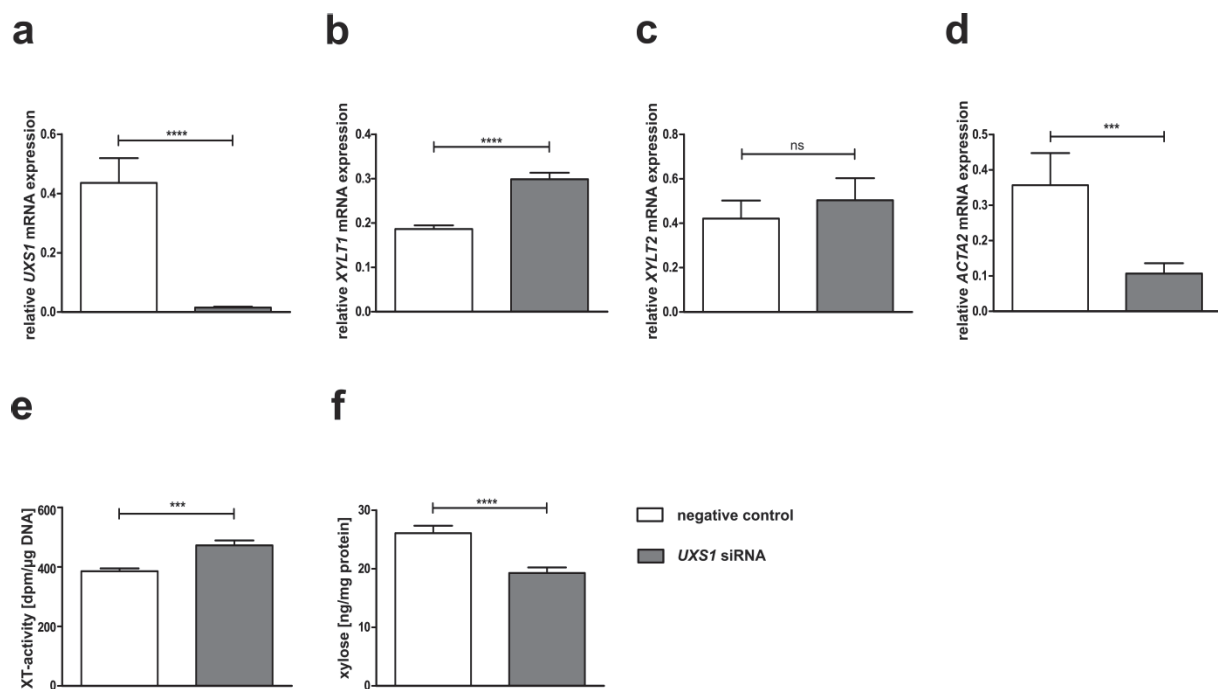


Fig. 3: Relative mRNA expression levels of different ECM-related genes (a-d), extracellular XT-activity (e) and intracellular xylose concentration (f) after conducting an *UXS1* siRNA-knockdown. 24 h after seeding, NHDF cell lines (n=3) were treated with 40 nM of either *UXS1*-siRNA or control siRNA using Lipofectamine 2000. After an additional time of 48 h, total RNA was isolated and reverse transcribed. cDNA was used to determine relative mRNA gene expression levels of *UXS1* (a), *XYLT1* (b), *XYLT2* (c), and *ACTA* (d) by realtime-PCR. Data were normalized to a normalization factor, determined by calculating the geometric mean of *HPRT*, *GAPDH* and *B2M* mRNA expression levels, and expressed as a ratio to one cell line. 72 h after conducting the *UXS1* knockdown, extracellular XT-activity (radiochemical assay, e) and intracellular xylose-content (f) was determined. Values represent means \pm SEM. ns: not significant; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 (Mann–Whitney U-test).

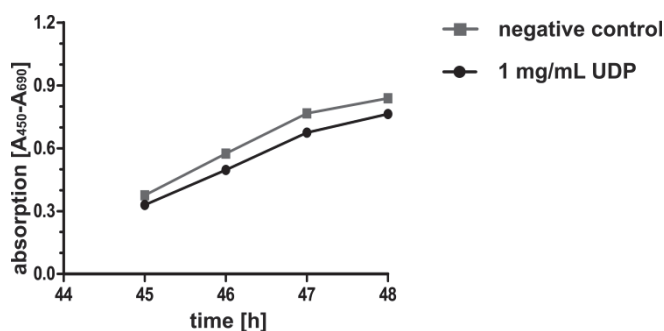
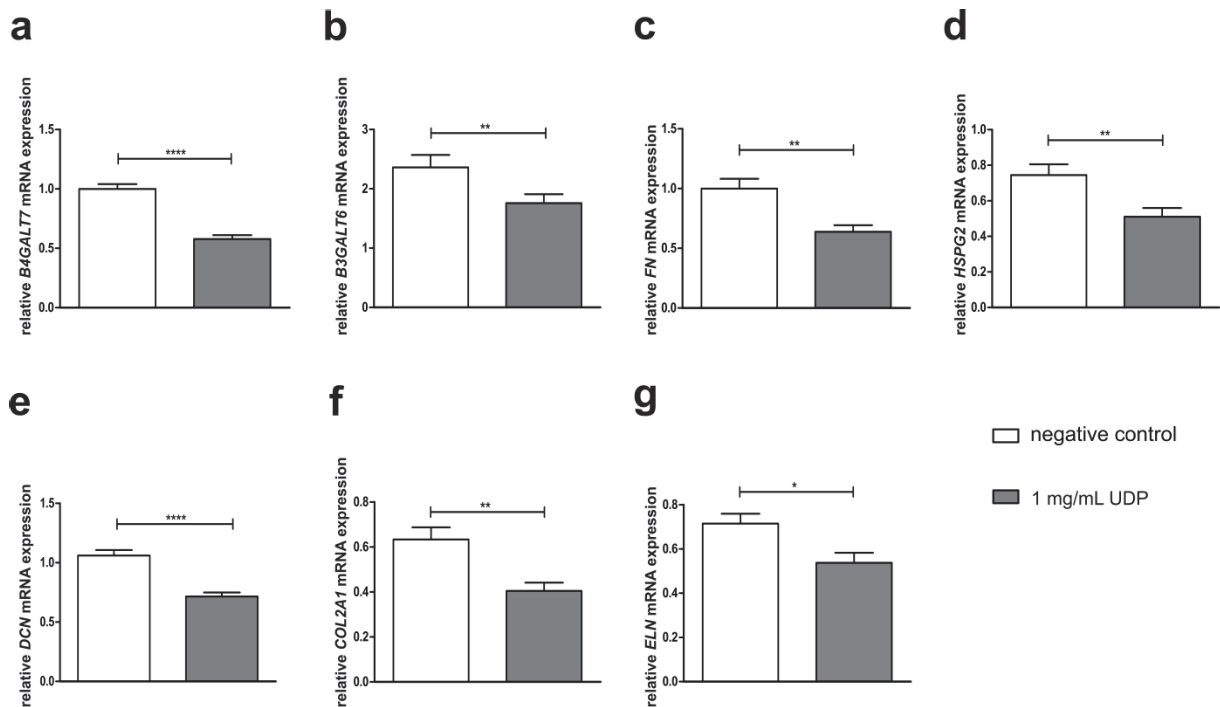
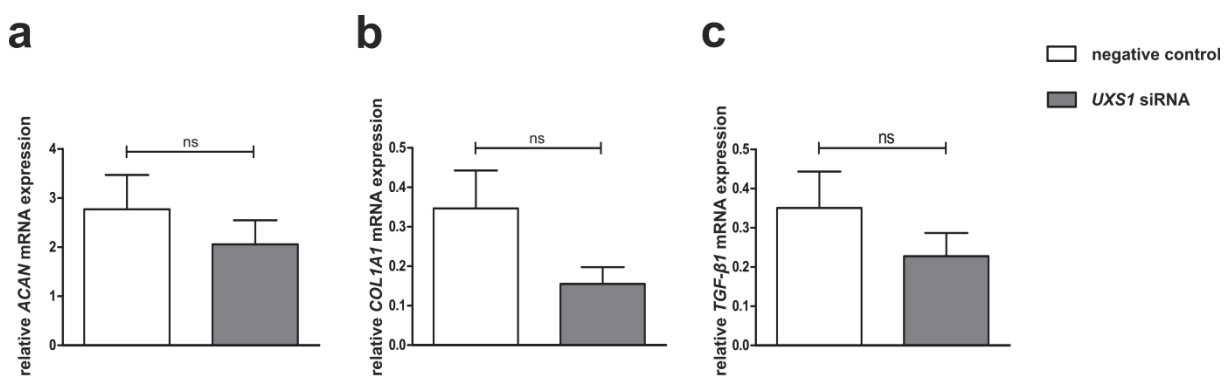


Fig. 4: Absorption of UDP-treated and untreated NHDF (n=3). To evaluate toxicity of UDP, we conducted an WST-1 proliferation assay within 44-48 h after UDP treatment.

Supplement



Supplement Fig. 1: Relative mRNA expression levels of different ECM-related genes 48 h after treating NHDF with UDP. 24 h after seeding NHDF cell lines (n=3) were treated with 1 mg/mL UDP. After an additional time of 48 h, total RNA was isolated and reverse transcribed. cDNA was used to determine relative mRNA gene expression levels of *B4GALT7* (a), *B3GALT6* (b), *FN* (c), *HSPG2* (d), *DCN* (e), *COL2A1* (f) and *ELN* (g) by realtime-PCR. Data were normalized to a normalization factor, determined by calculating the geometric mean of *HPRT*, *GAPDH* and *B2M* mRNA expression levels, and expressed as a ratio to one cell line. Values represent means \pm SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001 (Mann-Whitney U-test).



Supplement Fig. 2: Relative mRNA expression levels of different ECM-related genes after conducting an *UXS1* siRNA-knockdown. 24 h after seeding, NHDF cell lines (n=3) were treated with 40 nM of either *UXS1*-siRNA or control siRNA using Lipofectamine 2000. After an additional time of 48 h, total RNA was isolated and reverse transcribed. cDNA was used to determine relative mRNA gene expression levels of *ACAN* (a), *COL1A1* (b) and *TGF- β 1* (c) by realtime-PCR. Data were normalized to a normalization factor, determined by calculating the geometric mean of *HPRT*, *GAPDH* and *B2M* mRNA expression levels, and expressed as a ratio to one cell line. Values represent means \pm SEM. ns: not significant (Mann-Whitney U-test).

Supplement Tab. 1: List of realtime-PCR primer used in this study. F: forward, R: reverse.

Gene	Primer-pair sequence
<i>XYLT1</i> (OMIM: 608124)	F: 5'- GAAGCCGTGGTGAATCAG - 3' R: 5'- CGGTCAGCAAGGAAGTAG - 3'
<i>XYLT2</i> (OMIM: 608125)	F: 5'- ACACAGATGACCCGCTTGTGG - 3' R: 5'- TTGGTGACCCGCAGGTTGTTG - 3'
<i>UXS1</i> (OMIM: 609749)	F: 5'- CAACCGCAGGAGGATGAAGC - 3' R: 5'- CCTGGATAGACCTGTTGAGTAGAA - 3'
<i>CD73</i> (OMIM: 129190)	F: 5'- CTCCTCTCAATCATGCCGCT - 3' R: 5'- TGGATTCCATTGTTGCGTTCA - 3'
<i>ACAN</i> (OMIM: 155760)	F: 5'- CACCCCATGCAATTTGAG - 3' R: 5'- GCCACTGTGCCCTTTTTA - 3'
<i>COL1A1</i> (OMIM: 120150)	F: 5'- GATGTGCCACTCTGACT - 3' R: 5'- GGGTTCTTGCTGATG - 3'
<i>TGF-β1</i> (OMIM: 190180)	F: 5'- GCGATACCTCAGCAACC - 3' R: 5'- ACGCAGCAGTTCTTCTCC - 3'
<i>ACTA2</i> (OMIM: 102620)	F: 5'- GACCGAATGCAGAAGGAG - 3' R: 5'- CGGTGGACAATGGAAGG - 3'
<i>B4GALT7</i> (OMIM: 604327)	F: 5'- CTCTCCGCACGATGTTCC - 3' R: 5'- GTCTCCTGCCCTTGTCCC - 3'
<i>B3GALT6</i> (OMIM: 615291)	F: 5'- CCCCCTGTGGTCTTTGTTG - 3' R: 5'- CGCCCCGTTTCTTCCTC - 3'
<i>FN</i> (OMIM: 135600)	F: 5'- CCCAGGGAAGATGTAGA - 3' R: 5'- CTCTTCCCGAACCTTATG - 3'
<i>HSPG2</i> (OMIM: 142461)	F: 5'- TGAACCCACAGCGAAAC - 3' R: 5'- GTGTAGGAGAGGGTGTATC - 3'
<i>DCN</i> (OMIM: 125255)	F: 5'- CCTCCGCTGTCAATG - 3' R: 5'- GCAGGTCTAGCAGAGTTG - 3'
<i>ELN</i> (OMIM: 130160)	F: 5'- AGCTCCAACCCCGTAAGTAGGAAT - 3' R: 5'- CCGCTAAGGCAGCCAAGTATGGA - 3'

Innovative particle standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM

Angelina Provost, Arnaud Favier, Marie-Thérèse Charreyre, Emma Reungoat, Nicolas Béard,
Eve-Isabelle Pécheur, Catherine Ladavière, Christophe Place, Karine Monier.

Key-words : Long-lived dSTORM, blinking particle standards, virus, centrosome, distal appendages, HCVpp, LipoParticles, polymer probe

Abstract

Calibration methods are still needed for dSTORM, a super-resolution technique overpassing the diffraction limit in optics. We have developed an innovative method based on blinking particle standards and conditions for long-lived imaging over several weeks. Stable localisation precisions in the 10 nm range are reached for single virions and centrosome appendages *in cellulo*. We successfully apply this method to calibrate 3D image reconstructions and achieve reliable tri-dimensional structures of biological specimens.

Cell biology has greatly benefited in the past years from the development of multiscale in optical microscopy, though remaining limited to a resolution of 200 nm due to the diffraction barrier. More recently, super-resolution optical microscopy methods^{1Betzig+Moerner+Hell}, such as direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM), have emerged as promising techniques providing large gain of resolution from about 200 nm to 20 nm, to explore wider horizons in all fields of biology. However, despite biologists' interest for optical molecular imaging with a 10 fold magnification, dSTORM has not been fully exploited due to several bottlenecks i) time-limited sample observations and ii) lack of calibration methods, especially for 3D implementation.

Direct STORM is based on the single-molecule localisation of blinking fluorophores that stochastically oscillate between ON bright state and OFF dark state. This blinking phenomenon enables to image high concentrations of fluorophores that otherwise would produce overlapping signals on the images. In practice, the improved resolution is attained by

accumulating gravity centres of blinking fluorophores detected overtime on several thousands of images. Blinking of dSTORM fluorophores is achieved in a special buffer containing a thiol reducer² and a low oxygen concentration thanks to the addition of an enzyme pair, glucose oxidase/catalase in the presence of glucose. Although efficient, this enzymatically de-oxygenated buffer acidifies rapidly, thus reducing dye blinking (Ollivier et al. 2013, PlosONE). Consequently, this short-lived buffer should be replaced every 2-3h, implying a delicate sample handling. Therefore, an alternative buffer is highly desirable to enable long-lived super-resolution imaging up to several days/weeks with optimal quality of image reconstruction.

Deciphering the third axial dimension of a cellular structure in optical microscopy is often based on the acquisition of multiple images at different focal planes (z-stacking), a non-compatible approach for fast acquisition like dSTORM. Exploiting 3D dSTORM is still a challenge. Special lenses (cylindrical or splitted) or optical pathways with specific imaging (TIRF, SAF) requiring adapted image analysis (review Dahan + Leveque-Fort) have been developed. The quality of 3D image reconstruction has to be assessed through calibration standards. While some standards are commercially available for 2D dSTORM, they are sorely lacking for 3D. Ideally, such calibration standards should be well-controlled micrometric-sized objects easy to label (with fluorophores in contact with the buffer).

Here, we present both a simple strategy to maintain an efficient blinking phenomenon up to several weeks (replacing the enzyme pair by a physically-deoxygenated buffer) and the design of blinking particle standards to evaluate i) this novel buffer independently of biological variability, and ii) the quality of 3D image reconstruction.

The innovative blinking standards developed herein are LipoParticles composed of spherical polymer particles^{REF Cath ACIS 2007} (Fig. 1A) labelled with fluorescent polymer chains exhibiting a lipid anchor (Supplementary Fig. 1). These polymer probes were designed here with AlexaFluor647® (AF647) fluorophores to provide excellent blinking capabilities. They are water-soluble, smaller than the localisation precision (hydrodynamic radius in the 3 nm-range for a 20,000 g.mol⁻¹ polymer chain)^{REF Damien2016}, and allow the bound AF647 to be at the LipoParticle surface in contact with the buffer. As observed by merging transmission and fluorescence images, an efficient labelling of the LipoParticles is achieved (Supplementary Fig. 2).

We first used these blinking particle standards to evaluate up to 6 days our innovative physically-de-oxygenated buffer (named Eternity buffer) in comparison with the classical enzyme-based buffer (Fig. 1B). Quantification was performed using ZEN software (Zeiss) to compare two parameters: number of blinking events per object and localisation precision. Implementation of IGOR software facilitated the visualisation of 2D reconstruction images (with a color/size code for localisation precision). While at initial time (D_0), image reconstruction is comparable with both buffers (Fig. 1Ba and 1Be), with a similar number of blinking events and a localisation precision around 20 nm (Fig. 1Bc,d,g,h), only Eternity buffer enables a correct image reconstruction at D_6 (Fig. 1Bf) with a 20 nm or less localisation precision (Fig. 1Bh). With classical buffer, blinking events decreased and localisation precision worsened (around 30 nm, Fig. 1Bb, 1Bc and 1Bd).

Then, the same dish sealed with Eternity buffer was used to follow over several weeks LipoParticle reconstruction (Fig. 1Ca-e), showing less than one third loss of blinking events and median number of photons over time (Fig. 1Cf and 1Cg). Therefore, after two months, it was still possible to observe a significant blinking phenomenon and to reconstruct accurate images, with a comparable localisation precision at D_{58} as at D_0 (Fig. 1Ch).

Note that another very interesting feature of Eternity buffer is its stability over a wide pH range (5 and 8) where most of biological phenomena occur (Supplementary Fig. 3). In contrast, the classical enzyme-based buffer requires a pH value of 8 to enable an efficient blinking phenomenon. Moreover, Eternity buffer is compatible with the use of a focus-maintaining system on the microscope, since the degassing method maintains the refractive index of the buffer close to that of water, contrary to other buffers with higher indexes (Olivier and al. 2013).

Based on the robustness and versatility of Eternity buffer compared to classical buffer, we employed it for dSTORM imaging of biological specimens (Fig. 2). We chose enveloped viral particles as the first specimen, *i.e.* pseudoparticles of the hepatitis C virus (HCVpp) (Fig. 2A-D). That example is especially relevant since the 100 nm HCV particle diameter is below conventional microscope resolution. We recently showed^{ref william} that the lipid envelope of HCVpp can be efficiently labelled with a lipid-polymer probe. Here, HCVpp were labelled with a new lipid-polymer-AF647 probe. TEM imaging confirmed that labelled viral particles have the same morphology than unlabelled ones, with neither lysis nor aggregation (Fig. 2D and Supplementary Fig. 4). dSTORM imaging provided the first 20 nm scale observations of

HCV in environmental conditions (Fig. 2B and 2C). Importantly, individual virions are visualised while only clusters could be imaged by conventional optical microscopy (Fig. 2A). Such new observations open the way to dSTORM imaging of HCV virions or other enveloped viruses inside their host cells.

The second biological structure we studied was the nine-fold symmetry of the distal appendages of mature centrosomes observed *in cellulo* (Fig. 2F) that has been imaged in the past by TEM *in vitro*^{REF Paintrand 1992}. Distal appendages are involved in ciliogenesis and overhang a well-organized microtubule centre, localised in the cytoplasm, in close vicinity to the nucleus (Fig. 2E). When Cep164, a protein of the distal appendages, is immuno-labeled, a single donut-like structure is visible in wide-field microscopy when properly oriented (Fig. 2E), while dSTORM imaging in Eternity buffer provided image reconstruction where the expected nine appendages were distinctly visible (Fig. 2F and 2G) either with a gaussian/centroid representation (Supplementary Fig. 5) or with an appropriate IGOR representation (Supplementary Fig. 6). Eternity buffer provided a significantly improved localization when BME was used as a reducer instead of MEA, due to higher photon collection (Supplementary Fig. 7). Localization maps of transversally oriented structures (reconstructed either with a gaussian/centroid representation or with an appropriate IGOR representation) correlated with the position of the distal appendages imaged by TEM (Supplementary Fig. 8). In addition, we demonstrated that Eternity buffer was successful for imaging centrosome appendages up to D₁₇ on the same slide (Fig. 2I-L) with a constant localisation precision below 10 nm over 2 weeks (Fig. 2O), demonstrating the long-lasting efficiency of Eternity buffer for biological samples.

Furthermore, we extended the evaluation by 3D dSTORM of Eternity buffer at centrosome with other red and far-red emitting fluorophores (DL650, DL550, AF647, Supplementary Fig. 9), enabling advantageous multicolour imaging capabilities.

Finally, we demonstrated that the labelled LipoParticles could also be used as a reference to validate 3D-dSTORM reconstructions of variant biological structures. Due to the principle of 3D-dSTORM reconstruction with a split lens, a calibration step with fluorescent sub-resolution beads is a pre-requisite to reassign the z coordinate to each fluorophore in post-acquisition treatment. To assay the quality of this calibration step, we used our blinking LipoParticles (Fig. 3A-H), using a demonstrated optimum of 100,000 images (Supplementary Fig. 10). Point spread function (PSF) 1 (approved by its ranking) generated 2D visualizations

of particle standards systematically truncated at the top (Fig. 3B and Supplementary Fig. 11), thereby leading to an incomplete 3D reconstructions in the z-direction (Fig. 3D and movies). Conversely, PSF 2 allowed complete 2D and 3D reconstructions (Fig. 3E-H and Supplementary Fig. 11) of LipoParticles. Of note, when these 2 PSF calibrations were used to process the same raw image sequence of Cep164 appendages (Fig. 3I-P), finer details were different on 3D visualizations (dotted lines and eye region on Fig. 3K,L,O,P). Since PSF 2 gave a better calibration with controlled-sized particle standards, the most correct reconstructions for the unknown structure of Cep164 are the one obtained with the same calibration (Fig. 3M-P). The objective choice of the most appropriate PSF would have been impossible without a previous reconstruction with our particle standards.

References (*celles qui apparaissent dans le Online Methods sont surlignées en jaune*)

[1] Bonnafous P, Perrault M, Le Bihan O, Bartosch B, Lavillette D, Penin F et al. Characterization of hepatitis C virus pseudoparticles by cryo-transmission electron microscopy using functionalized magnetic nanobeads. *J Gen Virol* 2010;91:1919-30.

[2] Collier KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000702.

[3] Blaising J, Lévy PL, Polyak SJ, Stanifer M, Boulant S, Pécheur EI. Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking. *Antiviral Res* 2013;100:215-9.

[4] Blaising J, Lévy PL, Gondeau C, Phelip C, Varbanov M, Teissier E, et al. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell Microbiol* 2013;15:1866-82.

[5] Bathfield M, D'Agosto F, Spitz R, Charreyre MT, Delair T. Versatile precursors of functional RAFT agents. Application to the synthesis of bio-related end-functionalized polymers. *J Am Chem Soc* 2006;128:2546-47.

[6] Bathfield M, D'Agosto F, Spitz R, Charreyre MT, Pichot C, Delair T. Sub-micrometer sized hairy latex particles synthesized by dispersion polymerization using hydrophilic macromolecular RAFT agents. *Macromol Rapid Comm* 2007;28:1540-5.

[7] Relogio P, Bathfield M, Haftek-Terreau Z, Beija M, Favier A, Giraud-Panis M-J, et al. Biotin-end-functionalized highly fluorescent water-soluble polymers. *Polym Chem* 2013;4:2968-81.

[8] Bathfield M, Daviot D, D'Agosto F, Spitz R, Ladavière C, Charreyre M-T, et al. Synthesis of Lipid-alpha-end-Functionalized Chains by RAFT polymerization. Stabilization of Lipid/Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* 2008;41:8346-53.

[9] Adjili S, Favier A, Massin J, Bretonnière Y, Lacour W, Lin Y-C, et al. Synthesis of multifunctional lipid-polymer conjugates: application to the elaboration of bright far-red fluorescent lipid probes. *RSC Adv* 2014;4:15569-78.

[10] Rajwa B, Bernas T, Acker H, Dobrucki J, Robinson JP. Single-and two-photon spectral imaging of intrinsic fluorescence of transformed human hepatocytes. *Microscopy research and technique* 2007;70:869-79.

[13] Favier A, D'Agosto F, Charreyre M-T, Pichot C. Synthesis of *N*-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* 2004;45:7821-30.

[14] Chapel C, Garcia C, Bartosch B, Roingeard P, Zitzmann N, Cosset FL, et al. Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *J Gen Virol* 2007;88:1133-43.

[15] Cepraga C, Gallavardin T, Marotte S, Lanoë PH, Mulatier J-C, Lerouge F, et al. Biocompatible well-defined fluorophore-polymer conjugates for photodynamic therapy and two-photon imaging. *Polym Chem* 2013;4:61-67.

[16] Boens N, Qin W, Barasić N, Hofkens J, Ameloot M, J. Pouget, et al. Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Anal Chem* 2007;79:2137-49.

[17] Thévenot J, Troutier A-L, Putaux JL, Delair T, Ladavière C. Effect of the Polymer Nature on the Structural Organization of Lipid/Polymer Particle Assemblies. *J Phys Chem B* 2008;112:13812-22.

[18] A.-L. Troutier, T. Delair, C. Pichot, C. Ladavière, Physicochemical and Interfacial Investigation of Lipid/Polymer Particle Assemblies. *Langmuir* 2005, 21, 1305-13.

[20] Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003;77:3181-90.

[21] Lavillette D, Tarr A, Voisset C, Donot P, Bartosch B, et al. Characterization of host-range and cell entry properties of hepatitis C virus of major genotypes and subtypes. *J Virol* 2005;41:265-74.

[22] Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-42.

[23] Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 2006;281:3909-17.

[24] Baumann J, Fayer MD. Excitation transfer in disordered two-dimensional and anisotropic three-dimensional systems: Effects of spatial geometry on time-resolved observables. *J Chem Phys* 1986;85:4087.

[25] Troutier A-L, Ladavière C. An overview of lipid membrane supported by colloidal particles. *Adv Colloid Interf Sci* 2007;133: 1-21.

[27] Nakayama K, Tamura M. What is the true origin of the bright red-orange autofluorescence in the hepatocytes? *Hepatology* 2010;51:1083-4.

[29] Udagawa M, Horie Y, Hirayama C. Aberrant porphyrin metabolism in hepatocellular carcinoma. *Biochem Med* 1984;31:131-9.

Acknowledgements

This work is supported by

Author contributions

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at...

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Correspondence and requests for materials should be addressed to.

Figure legends

Figure 1: Eternity buffer enables dSTORM imaging of fluorescent LipoParticles over longer periods of time than classical buffer.

[Panel A, white background]: Schematic representation of an innovative fluorescent LipoParticle. The 1 μm polymer core in blue is surrounded by lipid layers (green) where the polymer chains (black line) bearing the fluorophores (purple stars) are immobilized. [Panel B, orange background]: comparison of dSTORM LipoParticle reconstruction in classical (top, orange frame) and Eternity (bottom, blue frame) buffers at day 0 (Ba and Be) and day 6 (Bb and Bf). The dSTORM signals are color coded (5 to 60 nm, inverted rainbow scale) and have a size code (from a 1 to 10 ratio) according to their localisation precision. Number of blinking events (Bc and Bg) and median localisation precision (Bd and Bh) are presented in bar graph at day 0 and day 6. Standard deviation is indicated as a vertical line for each bar. [Panel C, blue background]: Reconstruction by dSTORM of a LipoParticle at day 1 (Ca), 7 (Cb), 14 (Cc), 36 (Cd) and 58 (Ce). Same color and size code as in Panel B. The number of blinking events (Cf), the median number of photons per events (Cg) and the median localisation precision in nm (Ch) are represented as a function of time. Standard deviations for three measurements are represented as error bars for each condition.

Figure 2: Eternity buffer enables dSTORM imaging of various biological specimens over time.

[Top panel, blue background]: Images of HCVpp labelled with AF647 polymer-dye conjugate obtained by Wide field fluorescence (A), dSTORM (B) where each point is represented by its centroid (Purple) and its gaussian width (white), dSTORM (C) where each point is color coded (5 to 90 nm; inverted rainbow color scale) and size coded (from a 1 to 2 ratio) as a function of its localisation precision, and TEM (stained with?) (D). [Bottom panel, blue background]: Fluorescent microscopy image of U2OS cells with DAPI labelled nucleus (E, Blue) and Cep164 protein immuno-detected with AF647 to label mature centrosome (purple) at the periphery of the nucleus. Shape of the cell is delineated with a white dotted line. Insert shows an enlargement of the centrosome region illustrating the epifluorescence resolution obtained for this donut-like structure. dSTORM image of the mature centrosome labeled with Cep164 using AF647 fluorophores (F) where each point is represented by its centroid (purple points) and its gaussian width (white). Similar dSTORM (G) where each point is color coded

(5 to 40 nm; inverted rainbow color scale) as a function of its localisation precision. Substructures appearing as blob are labelled from 1 to 9 on both images. TEM representation of a centrosome by Paintrand et al. showing the 9 subdistal appendages (H, A' arrow pointed one of the appendage) around the centriole core. Scale bar is 200 nm. [Bottom panel, blue background]: Distal appendage reconstructions by dSTORM with Cep164 at day 1 (I), 2 (J), 9 (K) and 17 (L) where each point is color coded (5 to 40 nm; inverted rainbow color scale) as a function of its localisation precision. For this experiment, cells were plated on a Willco dish. Number of blinking events per centrosome (M), average number of photons per event (N) and median of localisation precision (O) are presented as a function of time. Standard deviations are represented as error bars for each point.

Figure 3: 3D dSTORM calibration with LipoParticles to decipher centrosome ultra-structure [Left panel, blue background]: 3D dSTORM reconstructions visualized in 2D from density of points using the gaussian width (intensity varies from blue to white as a function of the density of points) of LipoParticles (A, B, E, F) and centrosomes (I, J, M, N) view from XY (left column) and XZ (right column). The dotted squares indicate the same area. dSTORM reconstructions are performed with point spread function 1 (PSF1 red ; A, B, I, J) or point spread function 2 (PSF2 green ; E, F, M, N). [right panel, blue background]: dSTORM reconstruction in 3D from surface rendering mode of LipoParticles (C, D, G, H) and centrosomes (K, L, O, P) from top view (left column) and side view (right column). dSTORM reconstructions are calculated with PSF1 (red ; C, D, K, L) or PSF2 (green ; G, H, O, P). The dotted squares indicate the same areas. The eye indicates the groove in the centrosome structure. LipoParticles are labelled with AF647 polymer-dye conjugate and centrosomes with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 in U2OS cells.

Movie 1: Animated 360° view of Fig. 3C, representing the 3D dSTORM reconstruction of a LipoParticle calculated with PSF 1 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized at a 30 fps speed. The truncated top part of the LipoParticle is visible on this reconstruction.

Movie 2: Animated 360° view of Fig. 3G, representing the 3D dSTORM reconstruction of a LipoParticle calculated with PSF 2 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized at a 30 fps speed. The truncated top part of the LipoParticle is absent on this reconstruction.

Movie 3: Animated 360° view of Fig. 3K, representing the 3D dSTORM reconstruction of the distal appendages of a centrosome detected in U2-OS cells calculated with PSF 1 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized at a 30 fps speed.

Movie 4: Animated 360° view of Fig. 3L, representing the 3D dSTORM reconstruction of the distal appendages of a centrosome detected in U2-OS cells calculated with PSF 1 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized side ways at a 30 fps speed.

Movie 5: Animated 360° view of Fig. 3O, representing the 3D dSTORM reconstruction of the distal appendages of a centrosome detected in U2-OS cells calculated with PSF 2 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized at a 30 fps speed.

Movie 6: Animated 360° view of Fig. 3P, representing the 3D dSTORM reconstruction of the distal appendages of a centrosome detected in U2-OS cells calculated with PSF 2 using a surface rendering mode performed with the ZEN software and visualized side ways at a 30 fps speed.

Test of 2 PSF calibration for 3D dSTORM on 3 different LipoParticles.

Figure S1: Lipid-polymer-AF647 probe. (A) Chemical structure; (B) Schematic representation with the polymer chain (black), the terminal lipid-group (green) and the covalently bound AF647 fluorophores (purple stars, average of 3 fluorophores per polymer chain); (C) Normalized absorption (full line) and fluorescence emission (dashed line) spectra in water of AF647 fluorophore (blue) and polymer probe (red), inset: photophysical characteristics of the polymer probe.

Figure S2: Large field of view of LipoParticles labelled with 0.1% of lipid-polymer-AF647 probe in epifluorescence (A, red) and transmission (C, white) mode. Merge of both images showing the high labelling ratio of LipoParticles (B).

Figure S3: Eternity buffer enables visualization of LipoParticles at pH 5 and 8.

dSTORM reconstruction of LipoParticles labeled with AF647 polymer-dye conjugates in Eternity buffer at pH=8 (A) and pH=5 (B). Points are color coded (5 to 60 nm; inverted rainbow scale) and size coded (from a 1 to 2 ratio) as a function of the localisation precision. Number of blinking events, median localisation precision and average number of photons per events are indicated below each image.

Figure S4: Large field of view of HCVpp isolated particles observed by TEM.

TEM images of HCVpp (stained with ? at ? w%) in the absence (A) or presence (B) of the lipid-polymer-AF647 probe showing structural similarity. Scale bar is 100 nm.

Figure S5: Different visualization modes of distal appendages imaged in dSTORM.

dSTORM reconstructions of distal appendages from U2OS cells detected with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 imaged in Eternity buffer. The ZEN software was used to represent the centroid positions of each event in purple (A), the isotropic gaussian width in white (C), as well as the merge of both (B).

Figure S6: IGOR parameters to display the precision of distal appendages imaged by dSTORM.

dSTORM reconstructions of distal appendages from U2OS cells detected with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 imaged in Eternity buffer. The dSTORM signals is color coded using the IGOR software (5 to 40 nm, inverted rainbow scale) and size coded from a 1 to 2 ratio, large size (A), from a 1 to 2 ratio, small size (B) and no size code, small size (C) according to the localisation precision.

Figure S7 : Optimization of Eternity robustness for dSTORM imaging.

dSTORM reconstruction from density of points using the gaussian width (intensity vary from blue to white as a function of the density of points) of centrosomes from U2OS cells labeled with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 imaged in Eternity buffer with mercaptoethanol (MEA, A) and β -mercaptoethylamine (BME, B). For these experiments, cells were plated on Willco dishes. A schematic drawing of the orientation of the centrosome is indicated as an insert in each image. [bottom panel]: Number of blinking events (C), median localisation precision (D) and median number of photons per event (E) are presented in bar graph as a function of the reducer agent BME (left, blue) and MEA (right, red). Number of the statistical population studied is indicated on each bar. A Student test ($\alpha=0.05$) is applied to test significance (*). Standard deviation is indicated as an error bar for each condition.

Figure S8: Cep 164 protein decorates the TEM distal appendages.

dSTORM reconstruction of centrosomes from U2OS cells labeled with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 imaged in Eternity buffer (left, A and D). The dSTORM signals is either a superposition of centroid positions (purple) and gaussian width (white) (A and B) or is color coded and size coded (D and E) according to the localisation precision. TEM image of isolated centrosome from Paintrand *et al.* showing the distal appendages (right, C and F). Merge of both images (center, B and E).

Figure S9 : Eternity buffer for multi-color 3D dSTORM with multiple fluorophores.

Statistical analysis of 27 series of 50,000 acquisition sequences performed on centrosome labeling obtained with Cep164 and pericentrin detected with 3 different fluorochromes. Bar graph of the number of photons (median number/centrosome A), the XY precision (median localization/centrosome in nm, B) and the Z precision (median localization/centrosome in nm, C) for DL650, DL550 and AF647 in classical buffer (orange, left) and Eternity buffer (blue, right). Standard deviations are represented as error bars. For each bar, 2 to 8 series were analyzed.

Figure S10: Influence of image number on 3D and 2D reconstructions with different visualization modes.

3D (A) and 2D (B) dSTORM reconstructions of a LipoParticle (A) and distal appendages of a centrosome (B) labelled with antibodies directed against Cep164 and secondaries labeled with AF647 imaged in Eternity buffer. Increased number of image subsets from the same series were processed using either the ZEN software to obtain reconstructions with a 3D surface rendering mode (A, left) and with a gaussian mode (B, left) or using the IGOR software to obtain reconstructions with for a precision mode displayed in purple (A, right) or in color coded way indicated on the right (B, right).

Figure S11: Test of 2 PSF calibrations for 3D dSTORM on 3 different LipoParticles.

3D dSTORM reconstructions of 3 different LipoParticles labelled with AF647 fluorophores using PSF1 (top, red frame) and PSF2 (bottom, green frame). The PSF representations in the 3D mode are splitted and twisted due to specific optics in the Elyra microscope (Zeiss) enabling the determination of the Z position relative to the focus plane. Artefacts due to noise are presents on the microslide surface.

Fig. 1: Eternity buffer enables dSTORM imaging of fluorescent Lipoparticles over longer periods of time than classical buffer

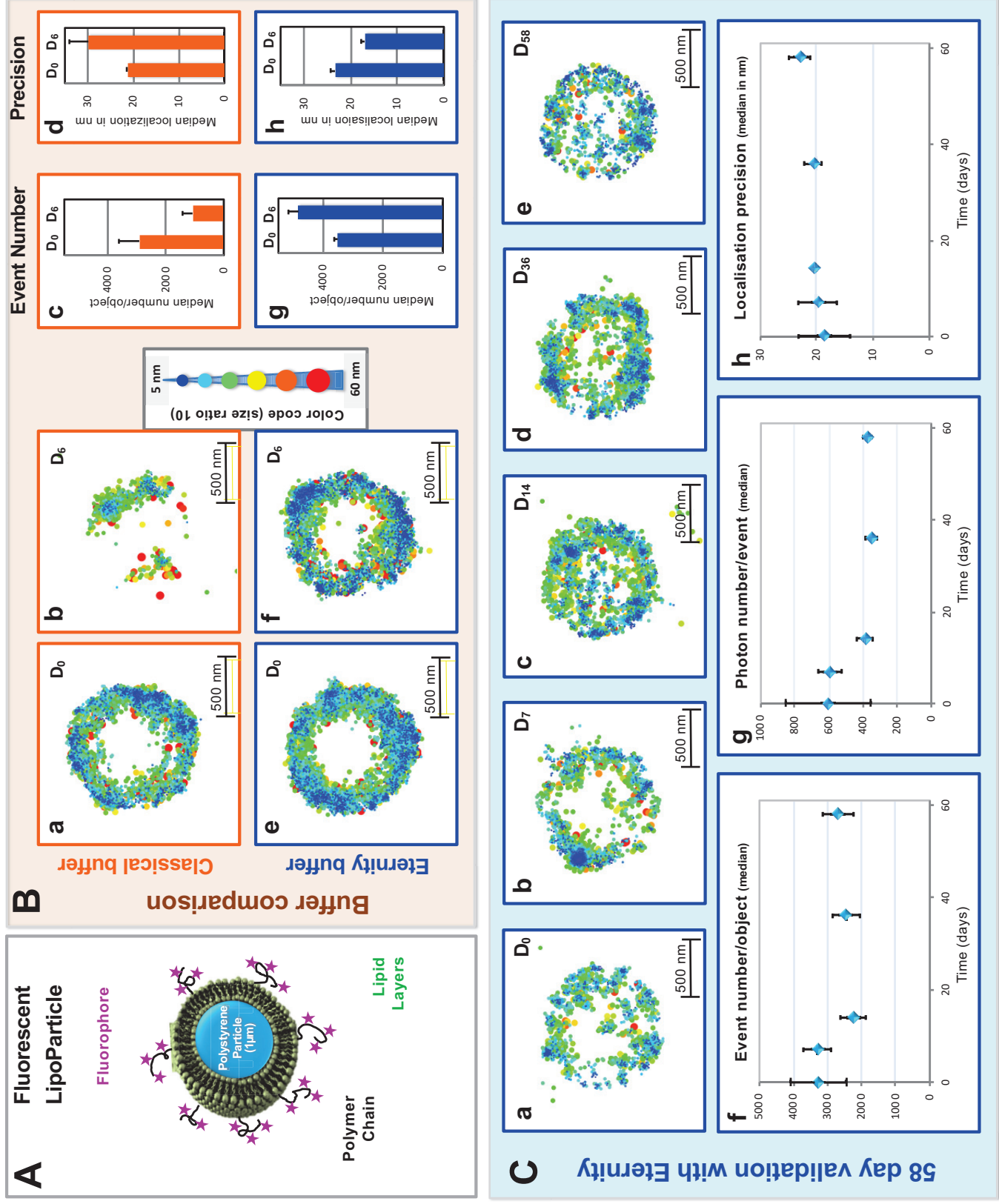


Fig. 2: Eternity buffer enables dSTORM imaging of various biological specimens over time

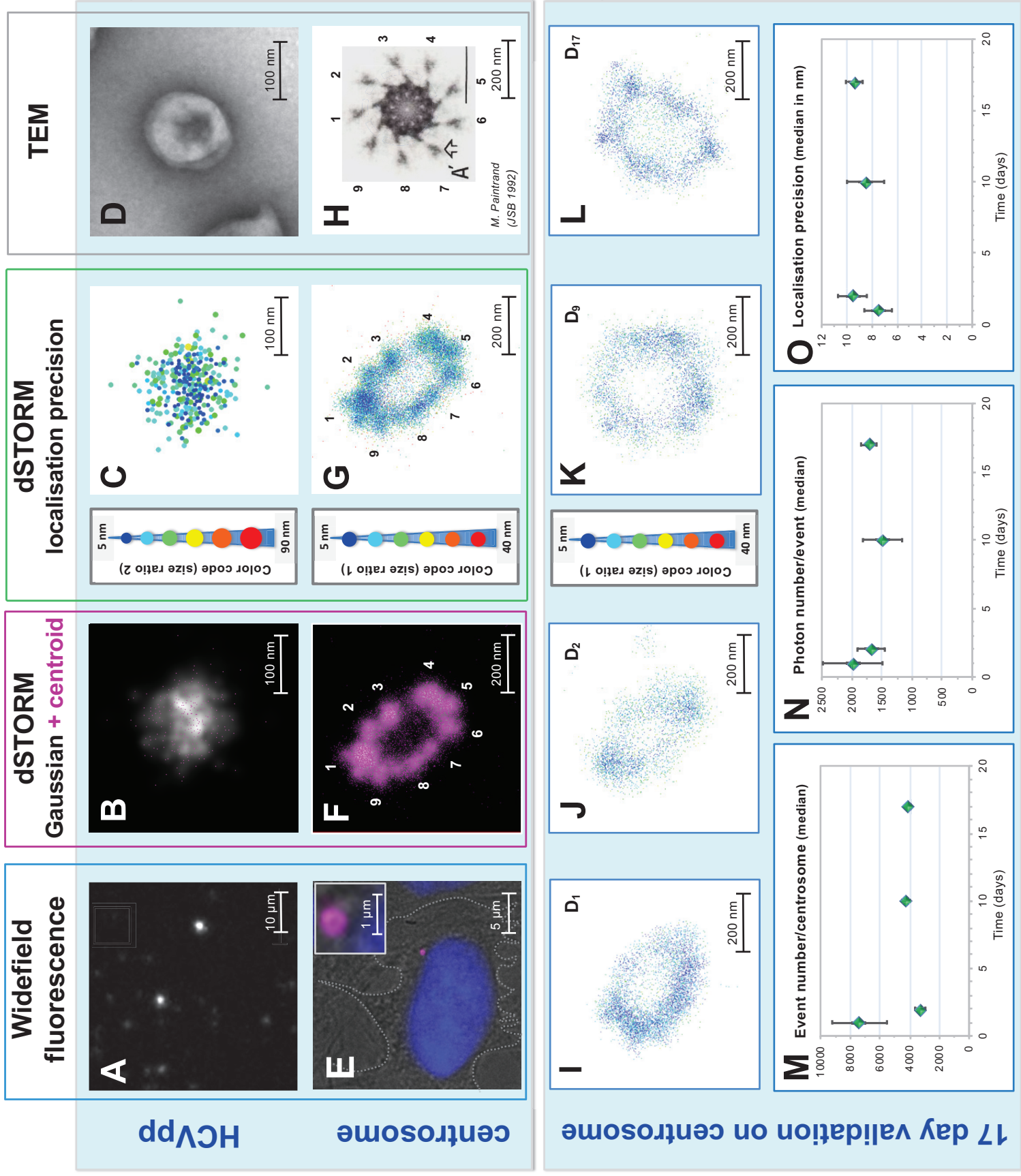


Fig. 3: 3D dSTORM calibration with LipoParticles to decipher centrosome ultra-structure

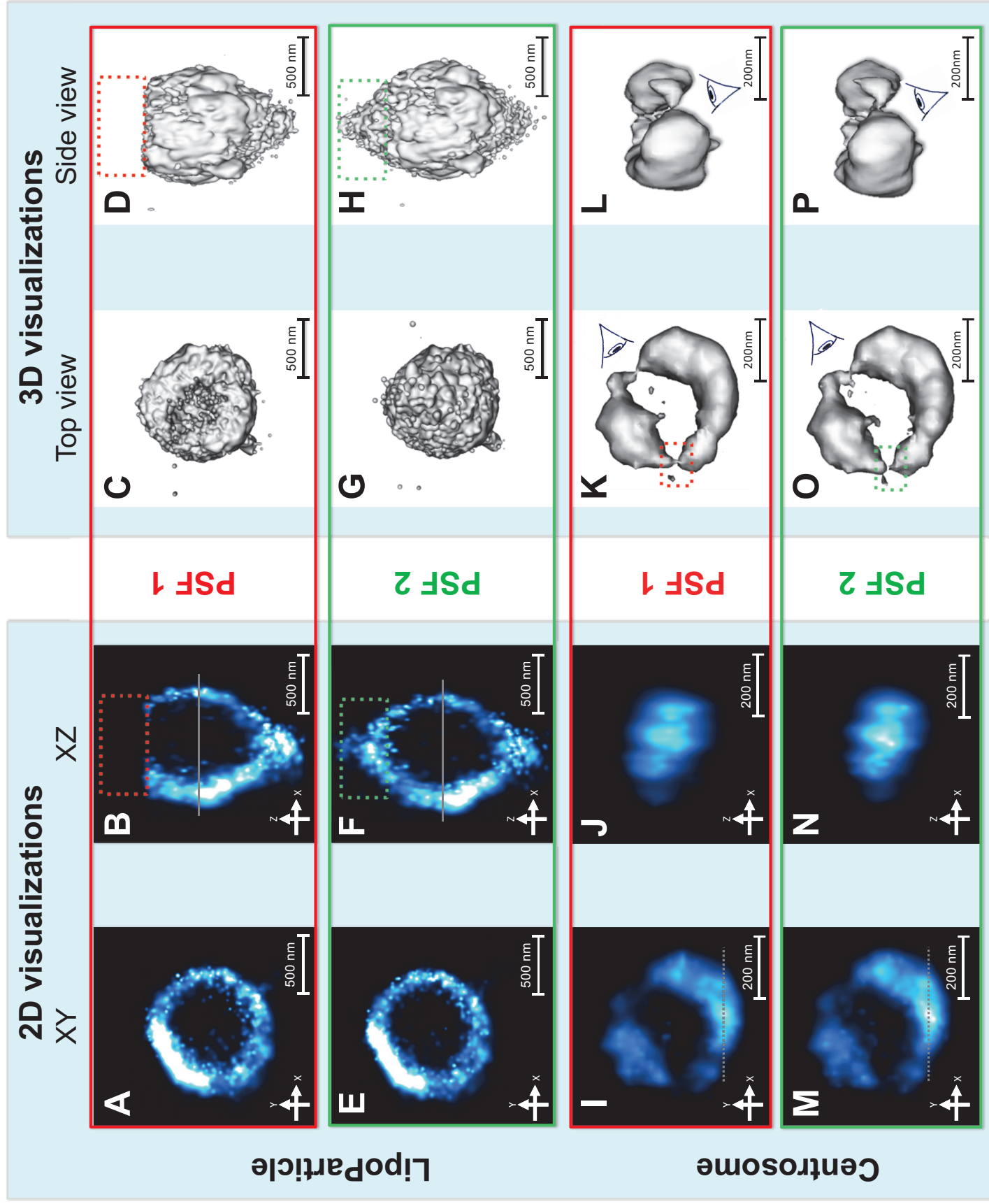


Fig. sup 1: Chemical structure and optical properties of the fluorescent lipid polymer probe

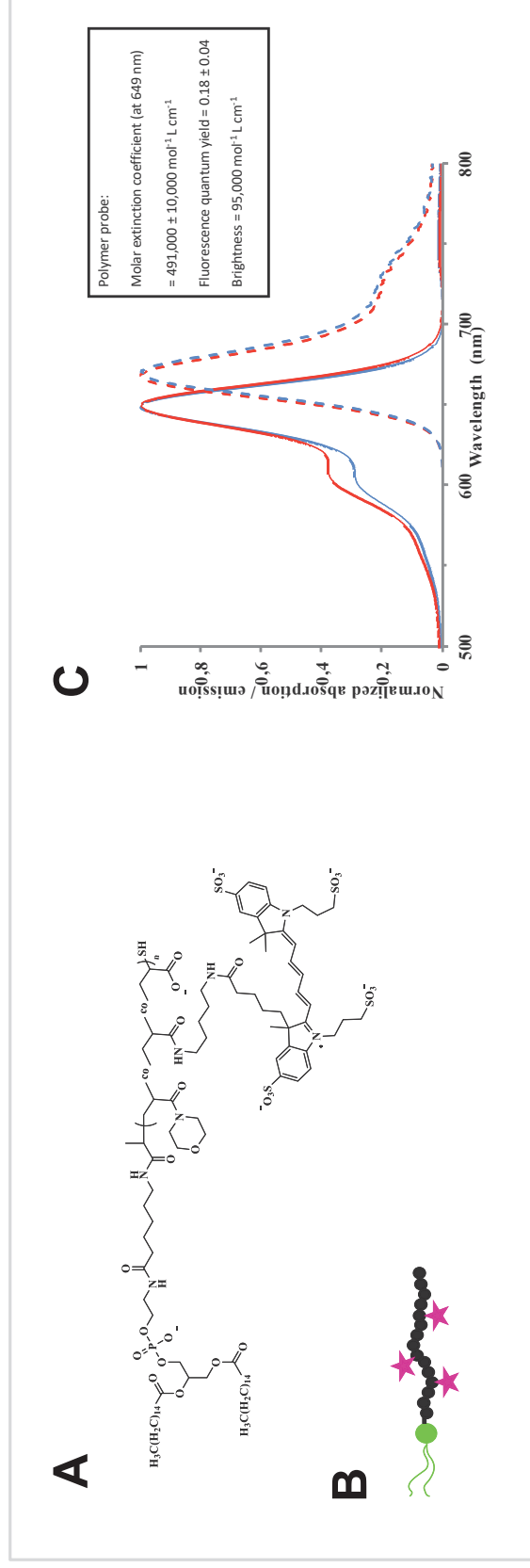


Fig. sup 2: Large field of view of LipoParticles in epifluorescence and transmission mode

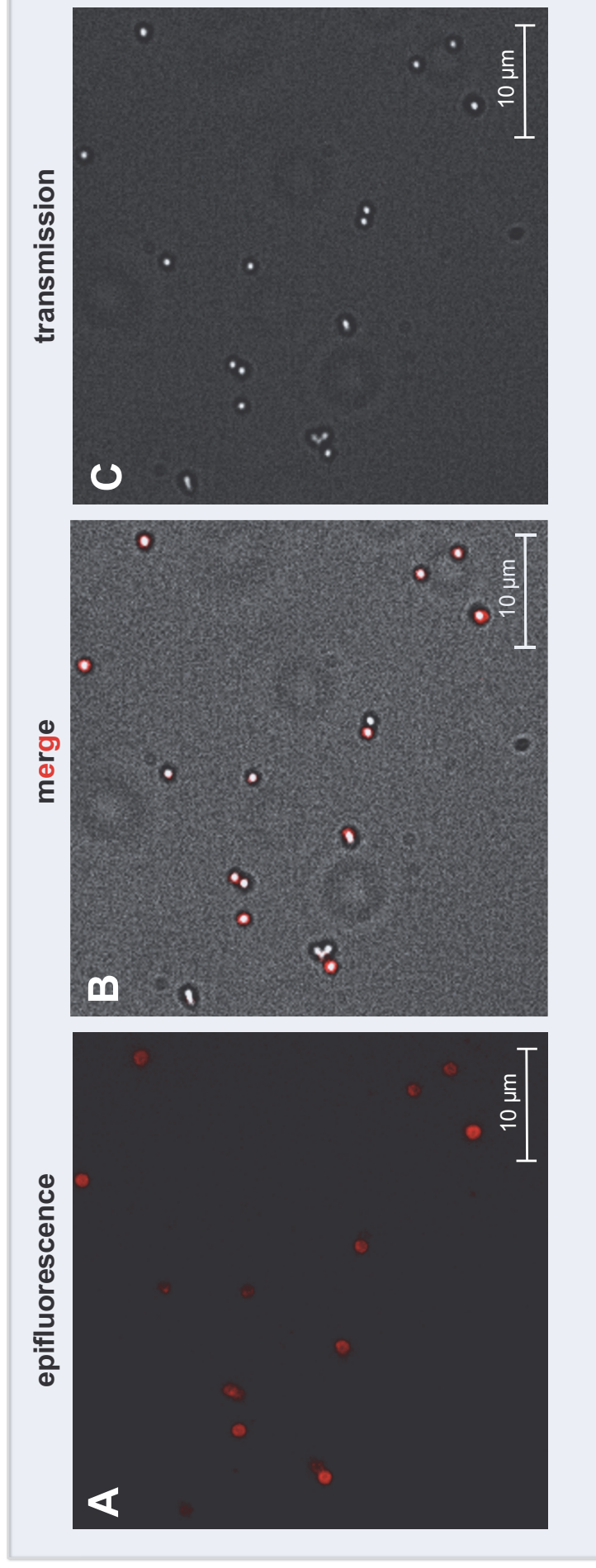


Fig. sup 3: Eternity buffer in acidic pH enables visualization of fluorescent standards

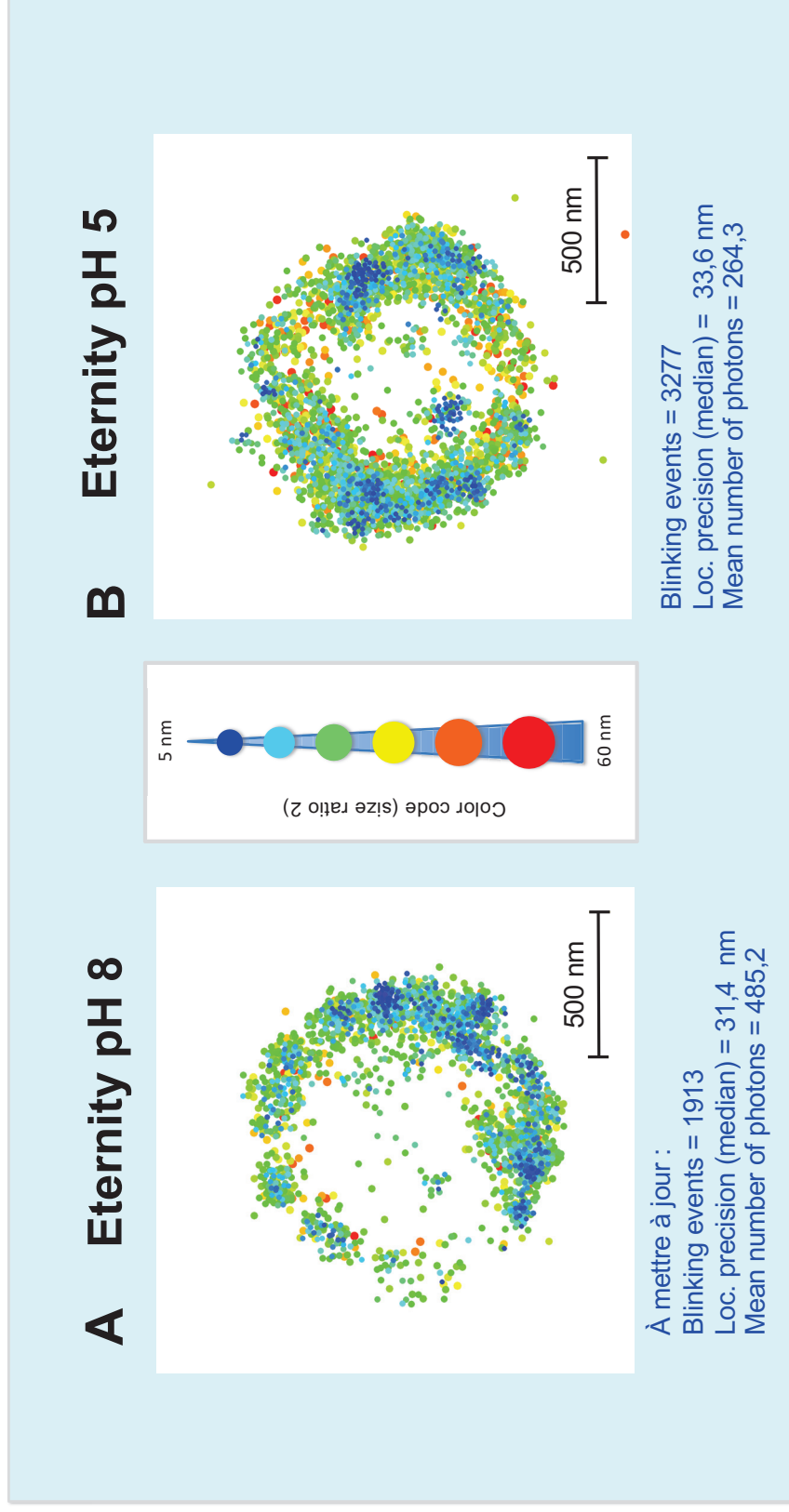


Fig. sup 4: Large field of view of HCVpp isolated particles observed by TEM.

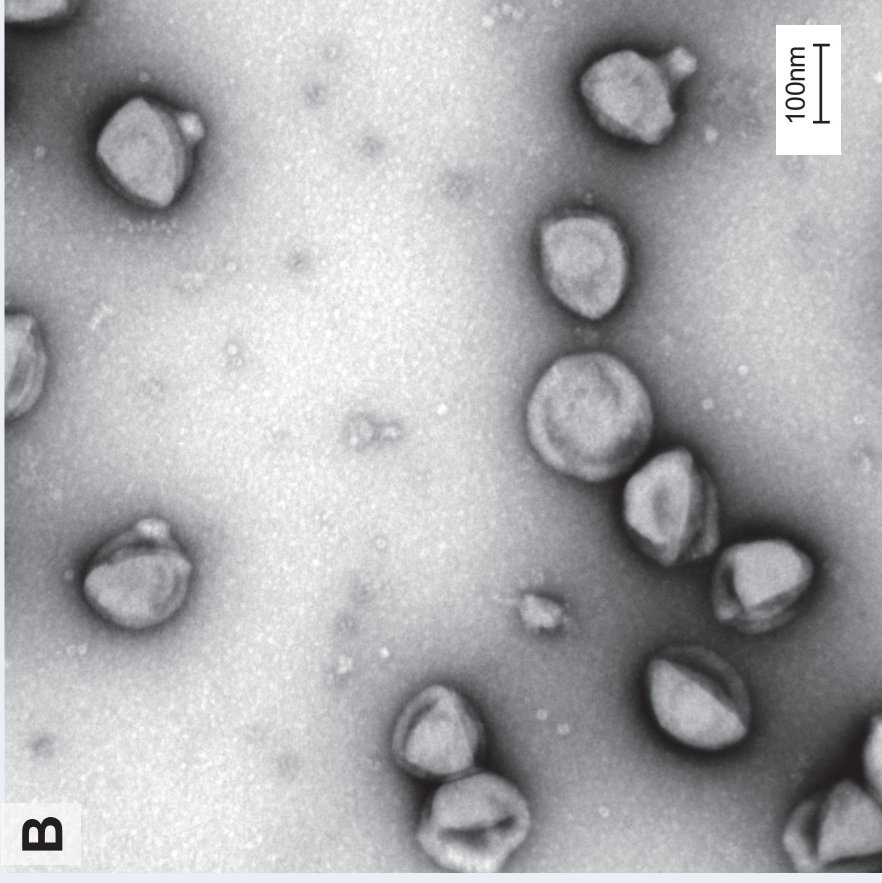
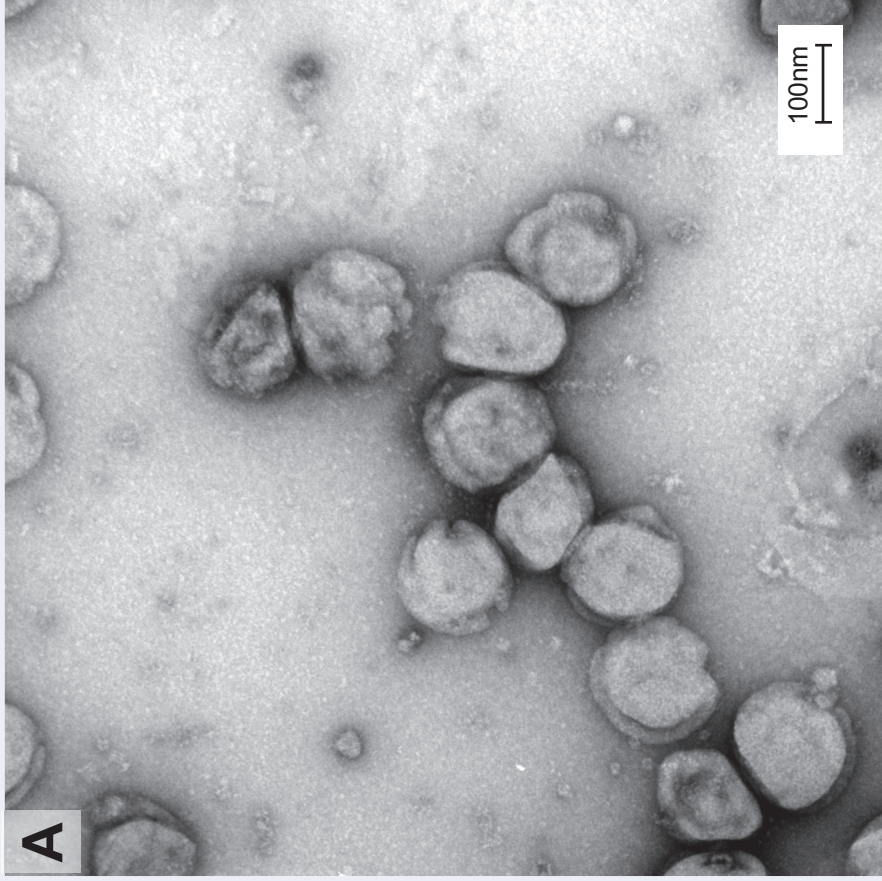


Fig. sup 5 : Different visualization modes of distal appendages imaged in dSTORM

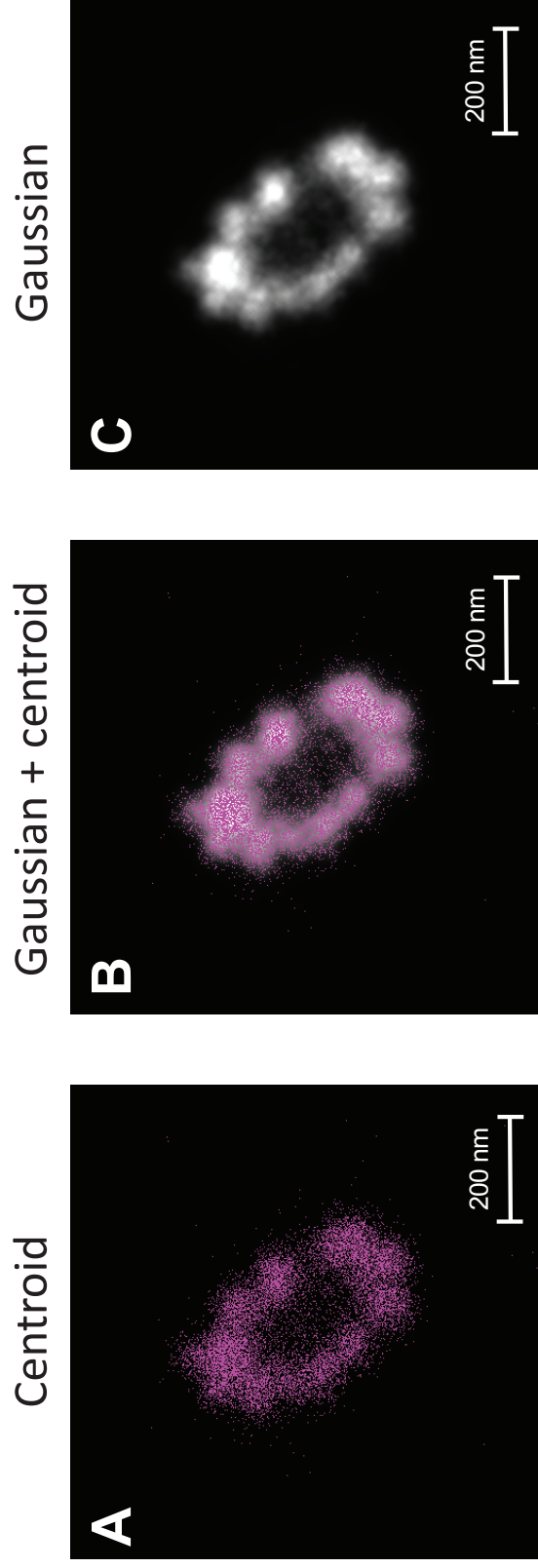


Fig. sup 6: Igor parameters to represent the precision of distal appendages imaged by dSTORM

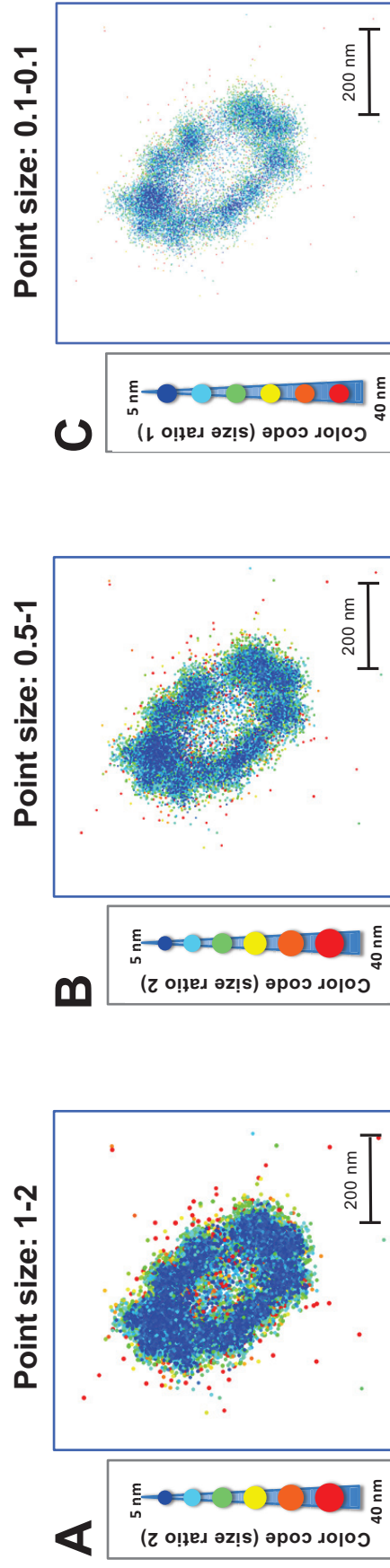


Fig. sup 7 : Optimization of Eternity robustness for dSTORM imaging

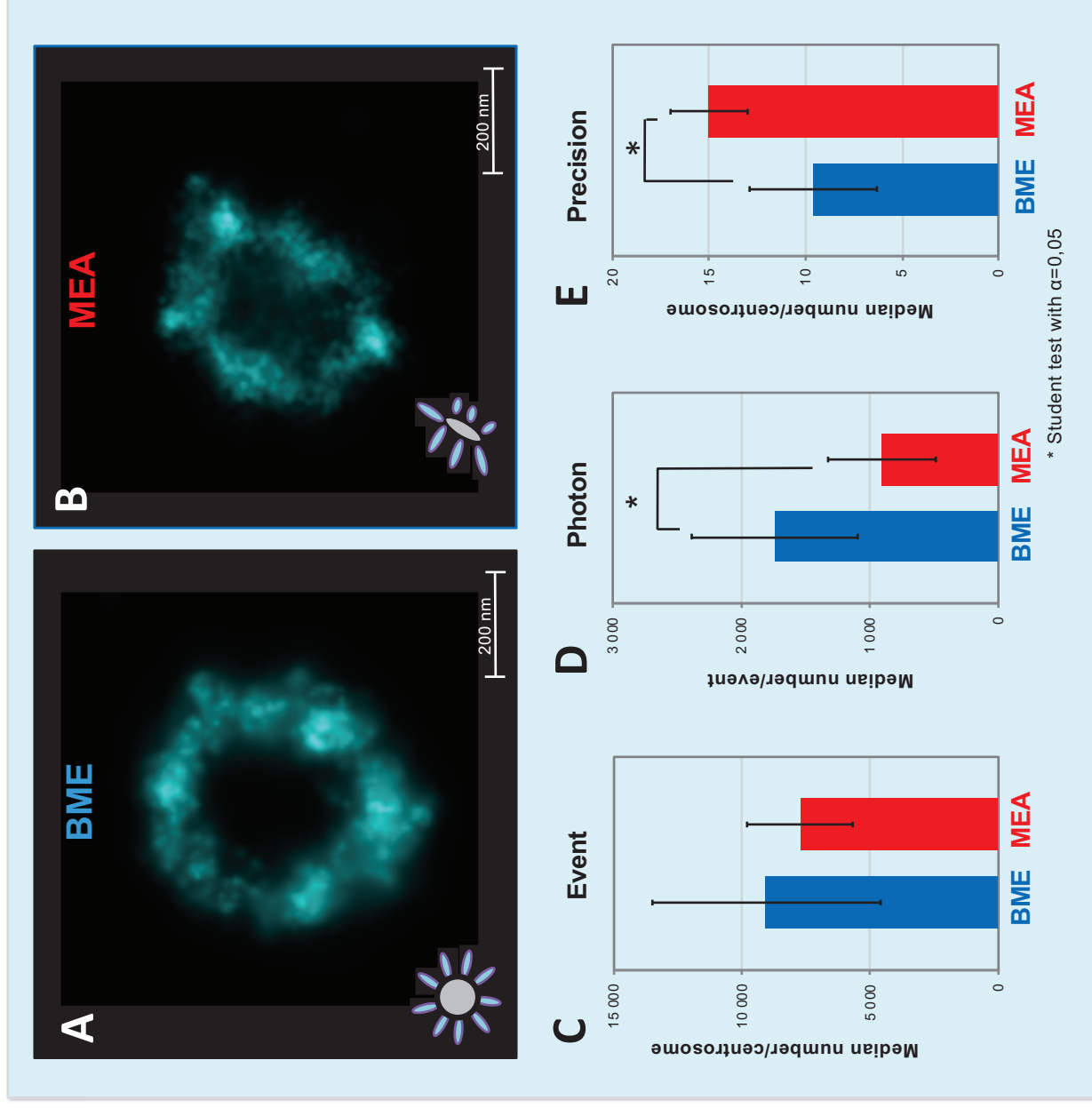


Fig. sup 8: Cep 164 protein decorates the TEM distal appendages

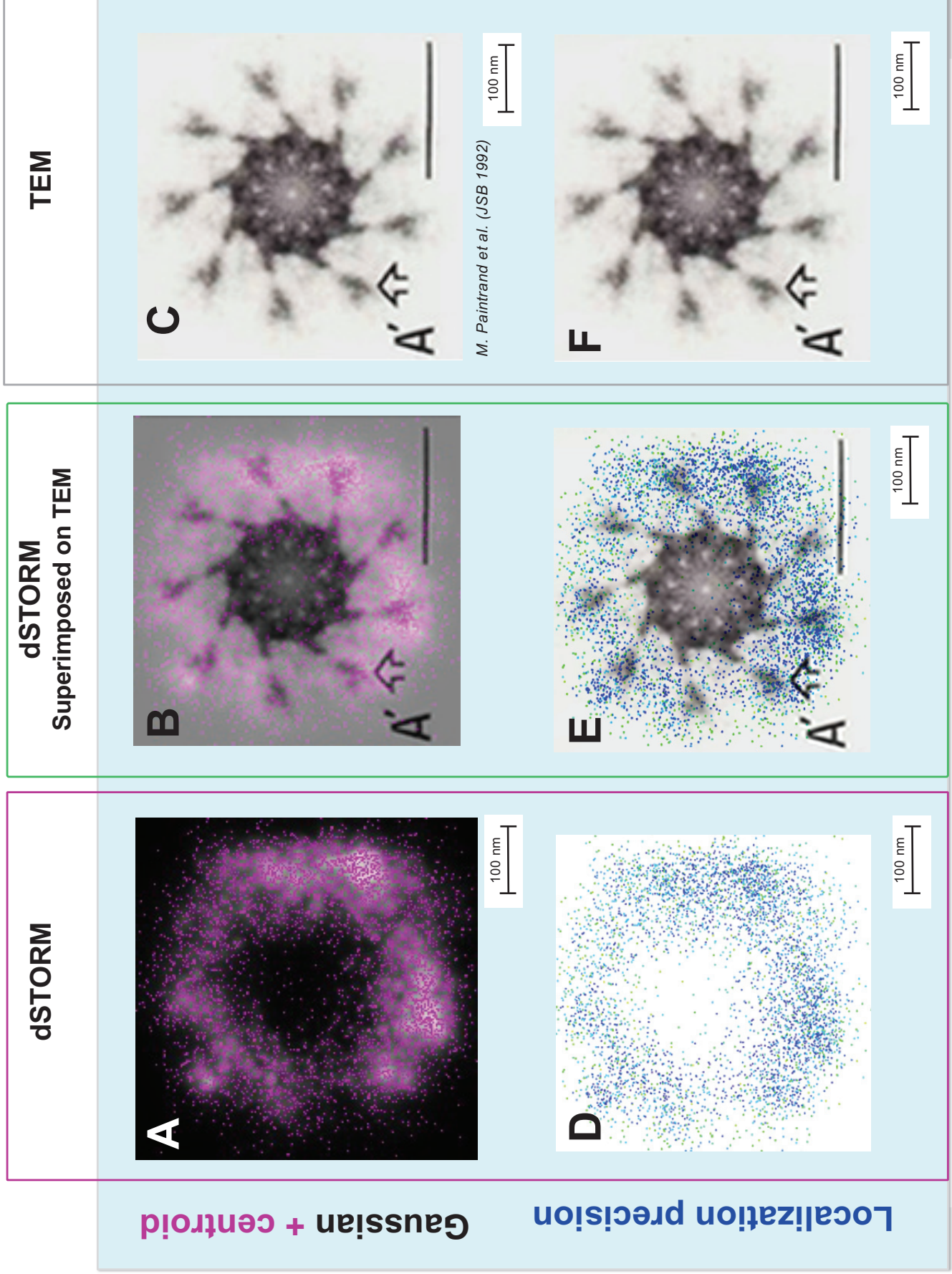
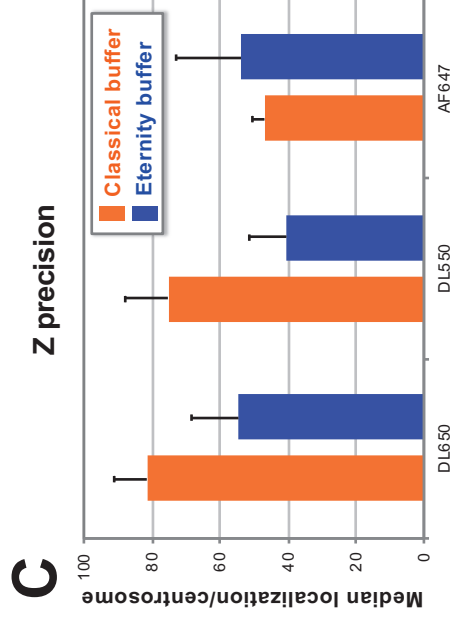
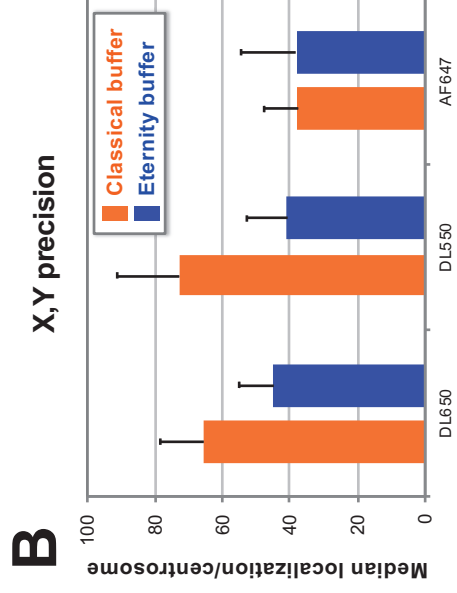
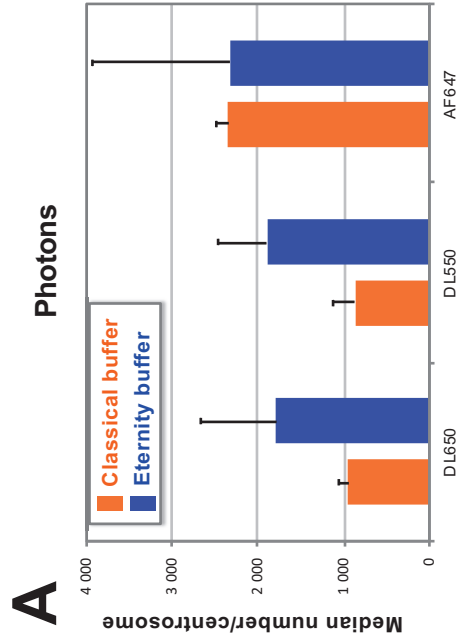


Fig. sup 9: Eternity buffer for double color 3D dSTORM with multiple fluorophores.



3
6
4
8
2
4

Fig. sup 10 : Influence of image numbers on 3D and 2D reconstructions with different visualization modes

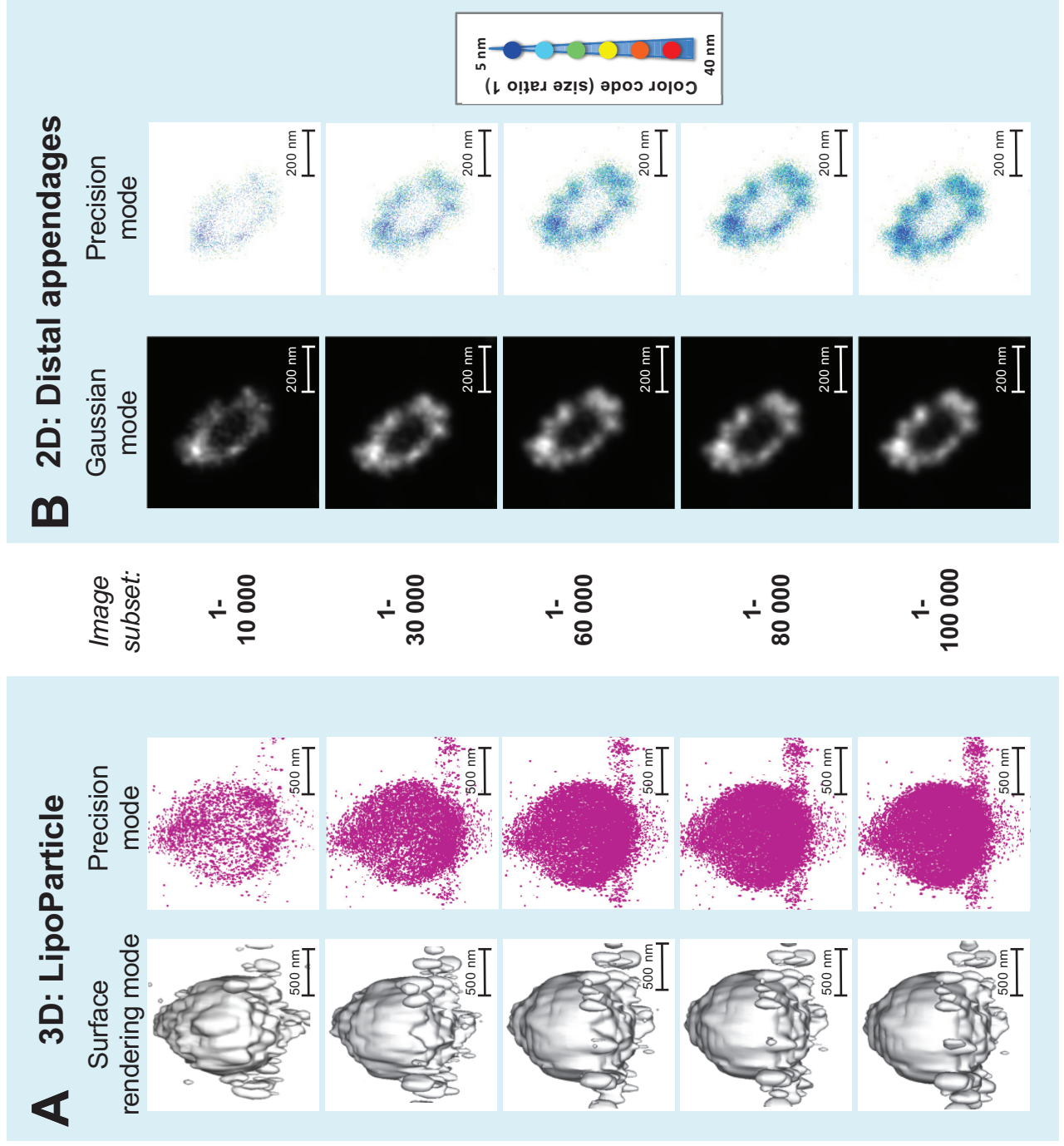


Fig. sup 11 : Test of 2 PSF calibrations for 3D dSTORM reconstructions on 3 different LipoParticles

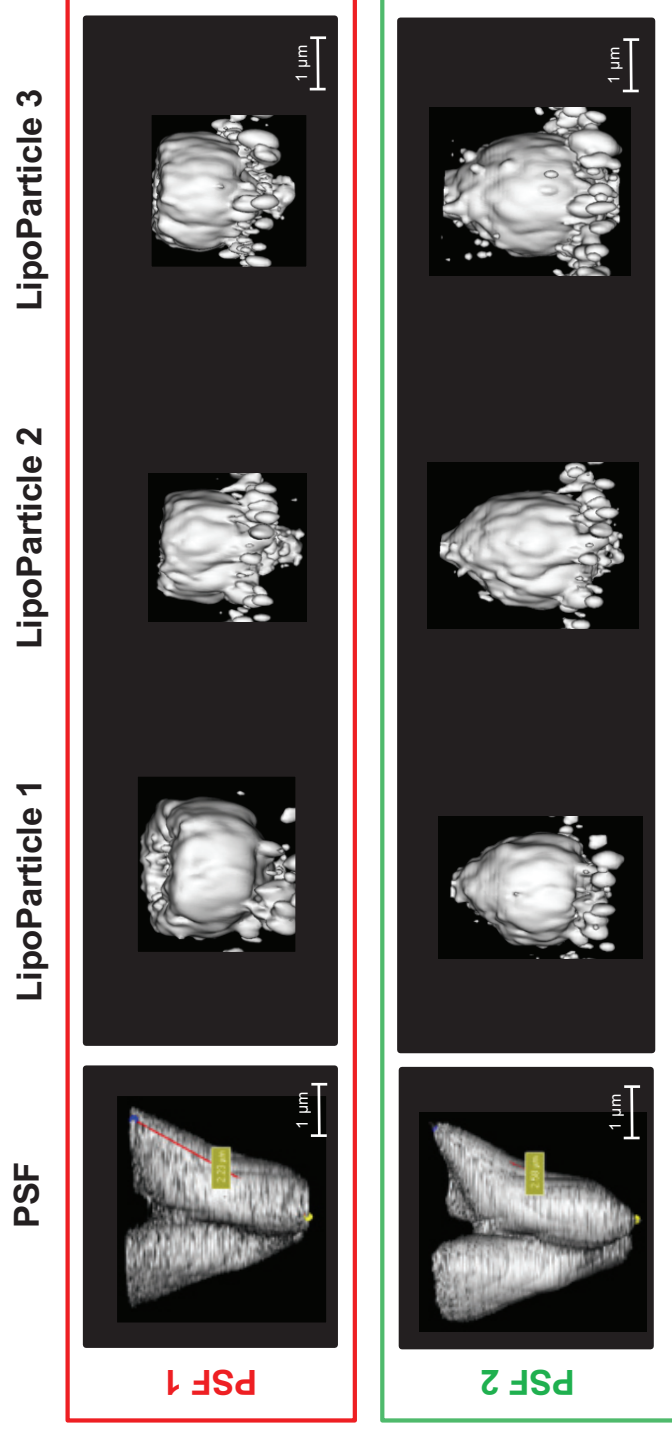
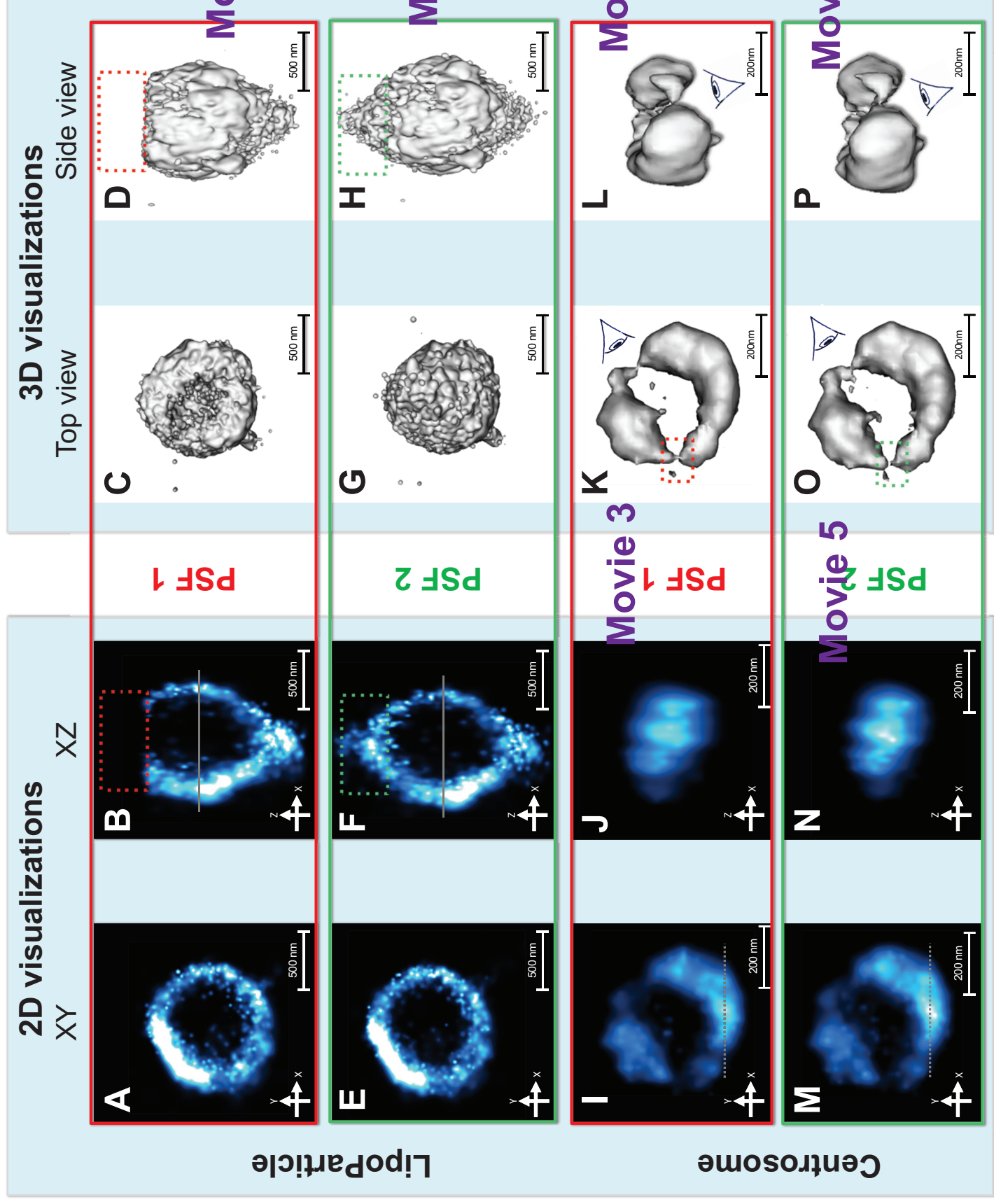


Fig. sup 12 : 6 movies

Fig. 3: 3D dSTORM calibration with LipoParticles to decipher centrosome ultra-structure



Références bibliographiques

1. Gordillo, M., Evans, T. & Gouon-Evans, V. Orchestrating liver development. *Development* **142**, 2094–2108 (2015).
2. Bogdanos, D. P., Gao, B. & Gershwin, M. E. Liver Immunology. *Compr. Physiol.* **3**, 567–598 (2013).
3. Duncan, A. W. *et al.* Frequent Aneuploidy Among Normal Human Hepatocytes. *Gastroenterology* **142**, 25–28 (2012).
4. Preziosi, M. E. & Monga, S. P. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration. *Semin. Liver Dis.* **37**, 141–151 (2017).
5. Bedossa, P. & Paradis, V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* **200**, 504–515
6. Friedman, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
7. Poisson, J. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* **66**, 212–227 (2017).
8. Braet, F. & Wisse, E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* **1**, 1 (2002).
9. DeLeve, L. D., Wang, X. & Guo, Y. Sinusoidal Endothelial Cells Prevent Rat Stellate Cell Activation and Promote Reversion to Quiescence. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 920–930 (2008).
10. García-Pagán, J.-C., Gracia-Sancho, J. & Bosch, J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J. Hepatol.* **57**, 458–461 (2012).
11. Ehling, J. *et al.* CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* **63**, 1960–1971 (2014).
12. Thabut, D. & Shah, V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol.* **53**, 976–980 (2010).
13. Ding, B.-S. *et al.* Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* **505**, 97–102 (2014).
14. Marrone, G. *et al.* The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial–stellate cell deactivation induced by statins. *J. Hepatol.* **58**, 98–103 (2013).
15. Abralde, J. G. *et al.* Addition of Simvastatin to Standard Therapy for the Prevention of Variceal Rebleeding Does Not Reduce Rebleeding but Increases Survival in Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology* **150**, 1160–1170.e3 (2016).
16. Liaskou, E., Wilson, D. V. & Oo, Y. H. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2012**, (2012).
17. Arriazu, E. *et al.* Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1078–1097 (2014).
18. Gressner, O. A., Weiskirchen, R. & Gressner, A. M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp. Hepatol.* **6**, 7 (2007).
19. Klaas, M. *et al.* The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
20. Wells, R. G. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* **47**, 1394–1400
21. Bornstein, P. Matricellular proteins: an overview. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 163–165 (2009).
22. Huxley-Jones, J., Foord, S. M. & Barnes, M. R. Drug discovery in the extracellular matrix. *Drug Discov. Today* **13**, 685–694 (2008).
23. Pomin, V. H. & Mulloy, B. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals* **11**, 27 (2018).
24. Lamari, F. N., Militsopoulou, M., Mitropoulou, T. N., Hjerpe, A. & Karamanos, N. K. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biologic samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomed. Chromatogr. BMC* **16**, 95–102 (2002).
25. Wang, W. *et al.* Sequencing of chondroitin sulfate oligosaccharides using a novel exolyase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Biochem. J.* **474**, 3831–3848 (2017).

26. Seidler, D. G., Peter-Katalinic, J. & Zamfir, A. D. Galactosaminoglycan Function and Oligosaccharide Structure Determination. *Sci. World J.* **7**, 233–241 (2007).
27. Pikulski, M., Hargrove, A., Shabbir, S. H., Anslyn, E. V. & Brodbelt, J. S. Sequencing and Characterization of Oligosaccharides Using Infrared Multiphoton Dissociation and Boronic Acid Derivatization in a Quadrupole Ion Trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 2094–2106 (2007).
28. Fullár, A. *et al.* Response of Hepatic Stellate Cells to TGFB1 Differs from the Response of Myofibroblasts. Decorin Protects against the Action of Growth Factor. *Pathol. Oncol. Res.* **23**, 287–294 (2017).
29. Ciftciler, R. *et al.* The importance of serum biglycan levels as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B. *J. Clin. Lab. Anal.* **31**, e22109
30. Whitelock, J. M., Melrose, J. & Iozzo, R. V. Diverse Cell Signaling Events Modulated by Perlecan. *Biochemistry* **47**, 11174–11183 (2008).
31. Lord, M. S. *et al.* The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. *Matrix Biol.* **68–69**, 150–166 (2018).
32. Wight, T. N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 617–623 (2002).
33. Ayerst, B. I., Merry, C. L. R. & Day, A. J. The Good the Bad and the Ugly of Glycosaminoglycans in Tissue Engineering Applications. *Pharmaceuticals* **10**, (2017).
34. Bukong, T. N., Maurice, S. B., Chahal, B., Schaeffer, D. F. & Winwood, P. J. Versican: a novel modulator of hepatic fibrosis. *Lab. Invest.* **96**, 361–374 (2016).
35. Kim, Y.-H., Nijst, P., Kiefer, K. & Wilson Tang, W. H. Endothelial Glycocalyx as Biomarker for Cardiovascular Diseases: Mechanistic and Clinical Implications. *Curr. Heart Fail. Rep.* **14**, 117–126 (2017).
36. Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T. A. & Walz, T. Structure of integrin $\alpha 5\beta 1$ in complex with fibronectin. *EMBO J.* **22**, 4607–4615 (2003).
37. Franco, C. R. C. *et al.* Glycosaminoglycan chains from alpha5beta1 integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **87**, 677–686 (2009).
38. Nam, E. J. & Park, P. W. Shedding of Cell Membrane-Bound Proteoglycans. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **836**, 291–305 (2012).
39. Chen, R. L. & Lander, A. D. Mechanisms Underlying Preferential Assembly of Heparan Sulfate on Glypican-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 7507–7517 (2001).
40. Filmus, J., Capurro, M. & Rast, J. Glypicans. *Genome Biol.* **9**, 224 (2008).
41. Sakane, H., Yamamoto, H., Matsumoto, S., Sato, A. & Kikuchi, A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J Cell Sci* **125**, 449–460 (2012).
42. Manon-Jensen, T., Itoh, Y. & Couchman, J. R. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* **277**, 3876–3889
43. Lin, X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009–6021 (2004).
44. Suflita, M., Fu, L., He, W., Koffas, M. & Linhardt, R. J. Heparin and related polysaccharides: Synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7465–7479 (2015).
45. Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037 (2007).
46. Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J. Med. Chem.* **46**, 2551–2564 (2003).
47. Wakao, M. *et al.* Synthesis of a chondroitin sulfate disaccharide library and a GAG-binding protein interaction analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 1407–1411 (2015).
48. Silbert, J. E. & Sugumaran, G. Biosynthesis of Chondroitin/Dermatan Sulfate. *IUBMB Life* **54**, 177–186
49. Abeijon, C., Mandon, E. C. & Hirschberg, C. B. Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 203–207 (1997).
50. Vu, T. H. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* **14**, 2123–2133 (2000).

51. Theocharis, A. D. *et al.* Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplays and pharmacological targeting in cancer. *FEBS J.* **281**, 5023–5042 (2014).
52. Itoh, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* **44–46**, 207–223 (2015).
53. Duarte, S., Baber, J., Fujii, T. & Coito, A. J. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* **44–46**, 147–156 (2015).
54. Milani, S. *et al.* Differential Expression of Matrix-Metalloproteinase-1 and -2 Genes in Normal and Fibrotic Human Liver. *Am. J. Pathol.* **144**, 528–537 (1994).
55. Hamada, T., Fondevila, C., Busuttil, R. W. & Coito, A. J. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* **47**, 186–198
56. Motrescu, E. R. *et al.* Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* **27**, 6347–6355 (2008).
57. McQuibban, G. A. *et al.* Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100**, 1160–1167 (2002).
58. Gaffney, J., Solomonov, I., Zehorai, E. & Sagi, I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* **44–46**, 191–199 (2015).
59. Przemyslaw, L., Boguslaw, H. A., Elzbieta, S. & Malgorzata, S. M. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. *BMB Rep.* **46**, 139–150 (2013).
60. McCawley, L. J. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 534–540 (2001).
61. HAYASHIDA, K., BARTLETT, A. H., CHEN, Y. & PARK, P. W. Molecular and Cellular Mechanisms of Ectodomain Shedding. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **293**, 925–937 (2010).
62. Wheeler, D. L., Ness, K. J., Oberley, T. D. & Verma, A. K. Protein Kinase C ϵ Is Linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Tumor Necrosis Factor- α Ectodomain Shedding and the Development of Metastatic Squamous Cell Carcinoma in Protein Kinase C ϵ Transgenic Mice. *Cancer Res.* **63**, 6547–6555 (2003).
63. Izumi, Y. *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 7260–7272 (1998).
64. Thabard, W., Collette, M., Bataille, R. & Amiot, M. Protein kinase C delta and eta isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells. *Biochem. J.* **358**, 193–200 (2001).
65. Matthews, V. *et al.* Cellular Cholesterol Depletion Triggers Shedding of the Human Interleukin-6 Receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* **278**, 38829–38839 (2003).
66. Tresckow, B. von *et al.* Depletion of Cellular Cholesterol and Lipid Rafts Increases Shedding of CD30. *J. Immunol.* **172**, 4324–4331 (2004).
67. Phong, M.-C. *et al.* Molecular mechanisms of L-selectin-induced co-localization in rafts and shedding [corrected]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 563–569 (2003).
68. Shi, M., Dennis, K., Peschon, J. J., Chandrasekaran, R. & Mikecz, K. Antibody-Induced Shedding of CD44 from Adherent Cells Is Linked to the Assembly of the Cytoskeleton. *J. Immunol.* **167**, 123–131 (2001).
69. Fitzgerald, M. L., Wang, Z., Park, P. W., Murphy, G. & Bernfield, M. Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains Is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mediated by a Timp-3–Sensitive Metalloproteinase. *J. Cell Biol.* **148**, 811–824 (2000).
70. Brill, A. *et al.* Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovasc. Res.* **84**, 137–144 (2009).
71. Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G. I., Jutila, M. A. & Kishimoto, T. K. Calmodulin Regulates L-Selectin Adhesion Molecule Expression and Function through a Protease-Dependent Mechanism. *Cell* **92**, 809–818 (1998).
72. Nagano, O. *et al.* Cell–matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation. *J. Cell Biol.* **165**, 893–902 (2004).

73. Reiss, K. *et al.* ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell–cell adhesion and β -catenin nuclear signalling. *EMBO J.* **24**, 742–752 (2005).
74. LaVoie, M. J. & Selkoe, D. J. The Notch Ligands, Jagged and Delta, Are Sequentially Processed by α -Secretase and Presenilin/ γ -Secretase and Release Signaling Fragments. *J. Biol. Chem.* **278**, 34427–34437 (2003).
75. Peschon, J. J. *et al.* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281–1284 (1998).
76. Garton, K. J. *et al.* Stimulated Shedding of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Is Mediated by Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* **278**, 37459–37464 (2003).
77. Sunnarborg, S. W. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Availability. *J. Biol. Chem.* **277**, 12838–12845 (2002).
78. Jackson, L. F. *et al.* Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* **22**, 2704–2716 (2003).
79. Elenius, K. *et al.* A Novel Juxtamembrane Domain Isoform of HER4/ErbB4 ISOFORM-SPECIFIC TISSUE DISTRIBUTION AND DIFFERENTIAL PROCESSING IN RESPONSE TO PHORBOL ESTER. *J. Biol. Chem.* **272**, 26761–26768 (1997).
80. Hori, K., Sen, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* **126**, 2135–2140 (2013).
81. Sato, C., Zhao, G. & Ilagan, M. X. G. An Overview of Notch Signaling in Adult Tissue Renewal and Maintenance. *Curr. Alzheimer Res.* **9**, 227–240 (2012).
82. Groot, A. J. & Vooijs, M. A. The Role of Adams in Notch Signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **727**, 15–36 (2012).
83. Sethi, M. K. *et al.* Molecular Cloning of a Xylosyltransferase That Transfers the Second Xylose to O-Glucosylated Epidermal Growth Factor Repeats of Notch. *J. Biol. Chem.* **287**, 2739–2748 (2012).
84. Li, Z. *et al.* Structural basis of Notch O-glucosylation and O-xylosylation by mammalian protein-O-glucosyltransferase 1 (POGLUT1). *Nat. Commun.* **8**, (2017).
85. Lee, T. V., Pandey, A. & Jafar-Nejad, H. Xylosylation of the Notch receptor preserves the balance between its activation by trans-Delta and inhibition by cis-ligands in *Drosophila*. *PLOS Genet.* **13**, e1006723 (2017).
86. Tsoukalas, N. *et al.* Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann. Transl. Med.* **6**, (2018).
87. De Francesco, E. M., Maggolini, M. & Musti, A. M. Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in Breast Cancer EMT. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
88. Harbuzariu, A. *et al.* The Role of Notch Signaling and Leptin-Notch Crosstalk in Pancreatic Cancer. *Medicines* **5**, 68 (2018).
89. Gil-García, B. & Baladrón, V. The complex role of NOTCH receptors and their ligands in the development of hepatoblastoma, cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Biol. Cell* **108**, 29–40 (2016).
90. Gomis-Rüth, F. X. *et al.* Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* **389**, 77–81 (1997).
91. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* **44–46**, 247–254 (2015).
92. Black, R. A. TIMP3 checks inflammation. *Nat. Genet.* **36**, 934–935 (2004).
93. Stanton, H. *et al.* The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J. Cell Sci.* **111**, 2789–2798 (1998).
94. Jackson, M. T., Moradi, B., Smith, M. M., Jackson, C. J. & Little, C. B. Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 1525–1536 (2014).
95. Ra, H.-J. *et al.* Control of Promatrilysin (MMP7) Activation and Substrate-specific Activity by Sulfated Glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **284**, 27924–27932 (2009).

96. Oh, J. *et al.* The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. *Cell* **107**, 789–800 (2001).
97. Pasco, S., Monboisse, J.-C. & Kieffer, N. The $\alpha 3(\text{IV})185\text{--}206$ Peptide from Noncollagenous Domain 1 of Type IV Collagen Interacts with a Novel Binding Site on the $\beta 3$ Subunit of Integrin $\alpha v\beta 3$ and Stimulates Focal Adhesion Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32999–33007 (2000).
98. Kim, Y.-M. *et al.* Endostatin Inhibits Endothelial and Tumor Cellular Invasion by Blocking the Activation and Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase 2. *Cancer Res.* **60**, 5410–5413 (2000).
99. Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G. & Galis, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* **98**, 2572–2579 (1996).
100. Rauch, B. H., Bretschneider, E., Braun, M. & Schrör, K. Factor Xa Releases Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) From Human Vascular Smooth Muscle Cells and Stimulates the Conversion of Pro-MMP-2 to MMP-2: Role of MMP-2 in Factor Xa-Induced DNA Synthesis and Matrix Invasion. *Circ. Res.* **90**, 1122–1127 (2002).
101. Morozov, V. A. & Lagaye, S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J. Hepatol.* **10**, 186–212 (2018).
102. Messina, J. P. *et al.* Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 77–87 (2015).
103. Hanafiah, K. M., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**, 1333–1342
104. Schietroma, I. *et al.* Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: Pathogenetic Mechanisms and Impact of Direct-Acting Antivirals. *Open Virol. J.* **12**, 16–25 (2018).
105. Cox, A. L. Global control of hepatitis C virus. *Science* **349**, 790–791 (2015).
106. Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362 (1989).
107. Piver, E., Bull, A., Roingeard, P. & Meunier, J.-C. Hépatite C : le serial killer photographié plus de 25 ans après sa mise en examen. *médecine/sciences* **33**, 720–723 (2017).
108. Yeung, L. T. F., King, S. M. & Roberts, E. A. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* **34**, 223–229
109. Polis, C. B., Shah, S. N., Johnson, K. E. & Gupta, A. Impact of Maternal HIV Coinfection on the Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: A Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1123–1131 (2007).
110. Fletcher, N. F. *et al.* Hepatitis C virus infection of cholangiocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* **96**, 1380–1388 (2015).
111. Lozach, P.-Y. *et al.* DC-SIGN and L-SIGN Are High Affinity Binding Receptors for Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *J. Biol. Chem.* **278**, 20358–20366 (2003).
112. Gardner, J. P. *et al.* L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4498–4503 (2003).
113. Wang, S.-F. *et al.* DC-SIGN mediates avian H5N1 influenza virus infection in cis and in trans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 561–566 (2008).
114. Plazolles, N. *et al.* Pivotal Advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 329–342
115. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* **100**, 587–597 (2000).
116. Shafiqi-Keramat, S. *et al.* Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *J. Virol.* **77**, 13125–13135 (2003).
117. de Witte, L. *et al.* Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19464–19469 (2007).

118. Schulze, A., Gripon, P. & Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**, 1759–1768 (2007).
119. Spear, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.* **6**, 401–410 (2004).
120. Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834–841 (1993).
121. Hilgard, P. & Stockert, R. Heparan Sulfate Proteoglycans Initiate Dengue Virus Infection of Hepatocytes. *Hepatology* **32**, 1069–1077 (2000).
122. Shi, Q., Jiang, J. & Luo, G. Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the Surfaces of Hepatocytes. *J. Virol.* **87**, 6866–6875 (2013).
123. Grigorov, B. *et al.* Hepatitis C virus infection propagates through interactions between Syndecan-1 and CD81 and impacts the hepatocyte glycocalyx. *Cell. Microbiol.* **19**, (2017).
124. Lefèvre, M., Felmlee, D. J., Parnot, M., Baumert, T. F. & Schuster, C. Syndecan 4 Is Involved in Mediating HCV Entry through Interaction with Lipoviral Particle-Associated Apolipoprotein E. *PLOS ONE* **9**, e95550 (2014).
125. Fan, H. *et al.* Attachment and Postattachment Receptors Important for Hepatitis C Virus Infection and Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* **91**, (2017).
126. Miao, Z. *et al.* Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses* **9**, (2017).
127. Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q.-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12766–12771 (1999).
128. Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002).
129. Bartosch, B. *et al.* An Interplay between Hypervariable Region 1 of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein, the Scavenger Receptor BI, and High-Density Lipoprotein Promotes both Enhancement of Infection and Protection against Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* **79**, 8217–8229 (2005).
130. Ding, Q., von Schaewen, M. & Ploss, A. The Impact of Hepatitis C Virus Entry on Viral Tropism. *Cell Host Microbe* **16**, 562–568 (2014).
131. Pileri, P. *et al.* Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
132. Diao, J. *et al.* Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J. Virol.* **86**, 10935–10949 (2012).
133. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 688–700 (2013).
134. Martin, D. N. & Uprichard, S. L. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 10777–10782 (2013).
135. Fillebeen, C. & Pantopoulos, K. Hepatitis C Virus Infection Causes Iron Deficiency in Huh7.5.1 Cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
136. I Mehrez, M., SA Fattah, D., AA Azeem, N., A Saleh, M. & M Mostafa, K. Hemochromatosis Gene Polymorphism as a Predictor of Sustained Virological Response to Antiviral Treatment in Egyptian Chronic Hepatitis C Patients. *Euroasian J. Hepato-Gastroenterol.* **7**, 154–157 (2017).
137. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
138. Liu, S. *et al.* Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014 (2009).
139. Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).
140. Sainz, B. *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* **18**, 281–285 (2012).
141. Ni, Y. *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**, 1070–1083 (2014).
142. Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–6972 (2006).

143. Blaising, J. *et al.* Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell. Microbiol.* **15**, 1866–1882 (2013).
144. Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E.-I. Low pH-dependent Hepatitis C Virus Membrane Fusion Depends on E2 Integrity, Target Lipid Composition, and Density of Virus Particles. *J. Biol. Chem.* **284**, 17657–17667 (2009).
145. Lavillette, D. *et al.* Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Low pH-dependent Membrane Fusion with Liposomes. *J. Biol. Chem.* **281**, 3909–3917 (2006).
146. Romero-Brey, I. *et al.* Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
147. Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *J. Hepatol.* **61**, S3–S13 (2014).
148. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581 (2005).
149. Chatel-Chaix, L. & Bartenschlager, R. Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside—Caught in the Web. *J. Virol.* **88**, 5907–5911 (2014).
150. Zeisel, M. B., Crouchet, E., Baumert, T. F. & Schuster, C. Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* **7**, 5659–5685 (2015).
151. Jirasko, V. *et al.* Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *PLoS Pathog.* **6**, e1001233 (2010).
152. Zayas, M., Long, G., Madan, V. & Bartenschlager, R. Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. *PLoS Pathog.* **12**, (2016).
153. Boyer, A. *et al.* The Association of Hepatitis C Virus Glycoproteins with Apolipoproteins E and B Early in Assembly Is Conserved in Lipoviral Particles. *J. Biol. Chem.* **289**, 18904–18913 (2014).
154. Ariumi, Y. *et al.* The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. *PLoS ONE* **6**, (2011).
155. Syed, G. H., Khan, M., Yang, S. & Siddiqui, A. Hepatitis C Virus Lipovirions Assemble in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Bud off from the ER to the Golgi Compartment in COPII Vesicles. *J. Virol.* **91**, (2017).
156. Timpe, J. M. *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**, 17–24
157. Barretto, N., Sainz, B., Hussain, S. & Uprichard, S. L. Determining the Involvement and Therapeutic Implications of Host Cellular Factors in Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* **88**, 5050–5061 (2014).
158. Xiao, F. *et al.* Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission and Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
159. Zeisel, M. B., Lupberger, J., Fofana, I. & Baumert, T. F. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C – Perspectives and challenges. *J. Hepatol.* **58**, 375–384 (2013).
160. Vegna, S. *et al.* NOD1 Participates in the Innate Immune Response Triggered by Hepatitis C Virus Polymerase. *J. Virol.* **90**, 6022–6035 (2016).
161. Horner, S. M. Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *J. Mol. Biol.* **426**, 1198–1209 (2014).
162. Asselah *et al.* Traitement de l'hépatite chronique c. *J Pharm Clin* (2006).
163. Liang, T. J. & Ghany, M. G. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1907–1917 (2013).
164. Un médicament efficace contre l'hépatite C vient d'être autorisé à la vente en pharmacie. (2018). Available at: <http://sante.lefigaro.fr/article/un-medicament-efficace-contre-l-hepatite-c-vient-d-etre-autorise-a-la-vente-en-pharmacie/>. (Accessed: 25th June 2018)
165. Chang, M.-L. Metabolic alterations and hepatitis C: From bench to bedside. *World J. Gastroenterol.* **22**, 1461–1476 (2016).

166. Banerjee, A., Meyer, K., Mazumdar, B., Ray, R. B. & Ray, R. Hepatitis C Virus Differentially Modulates Activation of Forkhead Transcription Factors and Insulin-Induced Metabolic Gene Expression. *J. Virol.* **84**, 5936–5946 (2010).
167. Shoji, I., Deng, L. & Hotta, H. Molecular Mechanism of Hepatitis C Virus-Induced Glucose Metabolic Disorders. *Front. Microbiol.* **2**, (2012).
168. Qadri, I. *et al.* Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *Biochem. J.* **378**, 919–928 (2004).
169. Brault, C. *et al.* Glutathione peroxidase 4 is reversibly induced by HCV to control lipid peroxidation and to increase virion infectivity. *Gut* **65**, 144–154 (2016).
170. Liang, H. & Ward, W. F. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 145–151 (2006).
171. Sheikh, M. Y., Choi, J., Qadri, I., Friedman, J. E. & Sanyal, A. J. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology* **47**, 2127–2133 (2008).
172. Moucari, R. *et al.* Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* **134**, 416–423 (2008).
173. Patel, K. *et al.* Insulin resistance is independently associated with significant hepatic fibrosis in Asian chronic hepatitis C genotype 2 or 3 patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 1182–1188 (2011).
174. Sersté, T. *et al.* Metabolic disorders associated with chronic hepatitis C: impact of genotype and ethnicity. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **30**, 1131–1136 (2010).
175. Diamond, D. L. *et al.* Temporal Proteome and Lipidome Profiles Reveal Hepatitis C Virus-Associated Reprogramming of Hepatocellular Metabolism and Bioenergetics. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
176. Sugiyama, K. *et al.* Prominent Steatosis with Hypermetabolism of the Cell Line Permissive for Years of Infection with Hepatitis C Virus. *PLoS ONE* **9**, (2014).
177. Woodhouse, S. D. *et al.* Transcriptome Sequencing, Microarray, and Proteomic Analyses Reveal Cellular and Metabolic Impact of Hepatitis C Virus Infection In Vitro. *Hepatology* **52**, 443–453 (2010).
178. Fabiani, S., Fallahi, P., Ferrari, S. M., Miccoli, M. & Antonelli, A. Hepatitis C virus infection and development of type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of the literature. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* (2018). doi:10.1007/s11154-017-9440-1
179. Gastaldi, G., Goossens, N., Clément, S. & Negro, F. Current level of evidence on causal association between hepatitis C virus and type 2 diabetes: A review. *J. Adv. Res.* **8**, 149–159 (2017).
180. Bedossa, P. & Paradis, V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* **200**, (2003).
181. Friedman, S. L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 425–436 (2010).
182. Sebastiani, G., Gkouvatsos, K. & Pantopoulos, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 11033–11053 (2014).
183. Florimond, A. *et al.* Human hepatic stellate cells are not permissive for hepatitis C virus entry and replication. *Gut* **64**, 957–965 (2015).
184. Aoudjehane, L. *et al.* Infection of Human Liver Myofibroblasts by Hepatitis C Virus: A Direct Mechanism of Liver Fibrosis in Hepatitis C. *PLoS ONE* **10**, (2015).
185. Devhare, P. B. *et al.* Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *J. Virol.* **91**, e02225-16 (2017).
186. Wang, Y., Li, J., Wang, X., Sang, M. & Ho, W. Hepatic stellate cells, liver innate immunity, and hepatitis C virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 112–115 (2013).
187. Bataller, R., Paik, Y.-H., Lindquist, J. N., Lemasters, J. J. & Brenner, D. A. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **126**, 529–540 (2004).
188. Iqbal, J., McRae, S., Banaudha, K., Mai, T. & Waris, G. Mechanism of Hepatitis C Virus (HCV)-induced Osteopontin and Its Role in Epithelial to Mesenchymal Transition of Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **288**, 36994–37009 (2013).

189. Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. & Siddiqui, A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9599–9604 (2001).
190. Bureau, C. *et al.* Nonstructural 3 Protein of Hepatitis C Virus Triggers an Oxidative Burst in Human Monocytes via Activation of NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 23077–23083 (2001).
191. Li, K., Prow, T., Lemon, S. M. & Beard, M. R. Cellular response to conditional expression of hepatitis C virus core protein in Huh7 cultured human hepatoma cells. *Hepatology. Baltim. Md* **35**, 1237–1246 (2002).
192. Bauer, M. & Bauer, I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 749–758 (2002).
193. Abdalla, M. Y., Mathahs, M. M. & Ahmad, I. M. Reduced heme oxygenase-1 expression in steatotic livers infected with hepatitis C virus. *Eur. J. Intern. Med.* **23**, 649–655 (2012).
194. Schulze-Krebs, A. *et al.* Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **129**, 246–258 (2005).
195. Lin, W. *et al.* HCV regulates TGF- β 1 production through the generation of reactive oxygen species in an NF κ B-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 2509–2518.e1 (2010).
196. Mazzocca, A. *et al.* Binding of Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Up-regulates Matrix Metalloproteinase-2 in Human Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 11329–11339 (2005).
197. Cheng, J.-C. *et al.* Activation of hepatic stellate cells by the ubiquitin C-terminal hydrolase 1 protein secreted from hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
198. Failli, P. *et al.* The mitogenic effect of platelet-derived growth factor in human hepatic stellate cells requires calcium influx. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **269**, C1133–C1139 (1995).
199. Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J. & Friedman, S. L. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J. Clin. Invest.* **94**, 1563–1569 (1994).
200. Meyer, D. H., Bachem, M. G. & Gressner, A. M. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1122–1129 (1990).
201. Svegliati-Baroni, G. *et al.* Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* **128**, 1042–1055 (2005).
202. Yoshiji, H. *et al.* Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* **52**, 1347–1354 (2003).
203. Inagaki, Y. & Okazaki, I. Emerging insights into Transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* **56**, 284–292 (2007).
204. Leask, A. & Abraham, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 816–827 (2004).
205. Dawood, R. M. *et al.* Dysregulation of fibrosis related genes in HCV induced liver disease. *Gene* **664**, 58–69 (2018).
206. Marra, F. & Bertolani, C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology. Baltim. Md* **50**, 957–969 (2009).
207. Rachfal, A. W. & Brigstock, D. R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatology. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **26**, 1–9 (2003).
208. Zhou, Y., Jia, X., Wang, G., Wang, X. & Liu, J. PI-3 K/AKT and ERK signaling pathways mediate leptin-induced inhibition of PPARgamma gene expression in primary rat hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biochem.* **325**, 131–139 (2009).
209. Sahin, H., Trautwein, C. & Wasmuth, H. E. Functional role of chemokines in liver disease models. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 682–690 (2010).
210. Schwabe, R. F., Bataller, R. & Brenner, D. A. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**, G949–958 (2003).
211. Sahin, H. *et al.* Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology. Baltim. Md* **55**, 1610–1619 (2012).
212. Zaldivar, M. M. *et al.* CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology. Baltim. Md* **51**, 1345–1353 (2010).

213. De Minicis, S. *et al.* Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut* **57**, 352–364 (2008).
214. Jeong, W. *et al.* Paracrine Activation of Hepatic CB1 Receptors by Stellate Cell-Derived Endocannabinoids Mediates Alcoholic Fatty Liver. *Cell Metab.* **7**, 227–235 (2008).
215. Ruddell, R. G. *et al.* A Role for Serotonin (5-HT) in Hepatic Stellate Cell Function and Liver Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **169**, 861–876 (2006).
216. Zhan, S.-S. *et al.* Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* **43**, 435–443 (2006).
217. MacDonald, G. A. *et al.* Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 599–606 (2001).
218. Choi, J. & James Ou, J.-H. Mechanisms of Liver Injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G847–G851 (2006).
219. Watanabe, A. *et al.* Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology* **46**, 1509–1518 (2007).
220. Sandrin, L. *et al.* Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med. Biol.* **29**, 1705–1713 (2003).
221. Goodman, Z. D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J. Hepatol.* **47**, 598–607 (2007).
222. Baiocchi, A. *et al.* Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLOS ONE* **11**, e0151736 (2016).
223. Nielsen, M. J. *et al.* Markers of Collagen Remodeling Detect Clinically Significant Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *PLOS ONE* **10**, (2015).
224. Shin, J. Y. *et al.* HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1. *Exp. Mol. Med.* **37**, 138–145 (2005).
225. Li, Y. *et al.* Hepatitis C Virus Activates Bcl-2 and MMP-2 Expression through Multiple Cellular Signaling Pathways. *J. Virol.* **86**, 12531–12543 (2012).
226. Preisser, L. *et al.* IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* **60**, 1879–1890 (2014).
227. Fontana, R. J. *et al.* Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut* **59**, 1401–1409 (2010).
228. Nielsen, M. J. *et al.* Plasma Pro-C3 (N-terminal type III collagen propeptide) predicts fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **35**, 429–437 (2015).
229. Guéchet, J. *et al.* Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J. Hepatol.* **20**, 388–393 (1994).
230. Leroy, V. *et al.* Changes in histological lesions and serum fibrogenesis markers in chronic hepatitis C patients non-responders to interferon alpha. *J. Hepatol.* **35**, 120–126 (2001).
231. Oberti, F. *et al.* Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* **113**, 1609–1616 (1997).
232. Pilette, C., Croquet, V., Vuillemin, E., Oberti, F. & Calès, P. [Non-invasive and early diagnosis of liver cirrhosis]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **23**, 557–565 (1999).
233. Omran, D. *et al.* Enhanced liver fibrosis test using ELISA assay accurately discriminates advanced stage of liver fibrosis as determined by transient elastography fibroscan in treatment naïve chronic HCV patients. *Clin. Exp. Med.* **18**, 45–50 (2018).
234. Lavie, M., Hanouille, X. & Dubuisson, J. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
235. Qin, X. *et al.* Comparative Analysis for Glycopolymers and Complex-Type N-Glycans of Glycoprotein in Sera from Chronic Hepatitis B- and C-Infected Patients. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
236. Eberts, T. J., Sample, R. H., Glick, M. R. & Ellis, G. H. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin. Chem.* **25**, 1440–1443 (1979).

237. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005).
238. Jammart, B. *et al.* Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)-Producing and Hepatitis C Virus-Replicating HepG2 Cells Secrete No More Lipovirions than VLDL-Deficient Huh7.5 Cells. *J. Virol.* **87**, 5065–5080 (2013).
239. Song, H. *et al.* Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture. *Virol. J.* **7**, 40 (2010).
240. Stepp, M. A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G. & Pajoohesh-Ganji, A. Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Adv. Wound Care* **4**, 235–249 (2015).
241. Barbosa, I. *et al.* Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **13**, 647–653 (2003).
242. Papy-Garcia, D. *et al.* Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration. *Curr. Protein Pept. Sci.* **12**, 258–268 (2011).
243. Kuhn, J. *et al.* Xylosyltransferase II is the predominant isoenzyme which is responsible for the steady-state level of xylosyltransferase activity in human serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **459**, 469–474 (2015).
244. Xu, G., Amicucci, M. J., Cheng, Z., Galermo, A. G. & Lebrilla, C. B. Revisiting monosaccharide analysis - quantitation of a comprehensive set of monosaccharides using dynamic multiple reaction monitoring. *The Analyst* **143**, 200–207 (2017).
245. Sarma, N. J. *et al.* Hepatitis C Virus Mediated Changes in miRNA-449a Modulates Inflammatory Biomarker YKL40 through Components of the NOTCH Signaling Pathway. *PLoS ONE* **7**, (2012).
246. Iwai, A., Takegami, T., Shiozaki, T. & Miyazaki, T. Hepatitis C Virus NS3 Protein Can Activate the Notch-Signaling Pathway through Binding to a Transcription Factor, SRCAP. *PLoS ONE* **6**, (2011).
247. Soares da Costa, D., Reis, R. L. & Pashkuleva, I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **19**, 1–26 (2017).
248. Kang, H. *et al.* Cancer Cell Glycocalyx and Its Significance in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2484 (2018).
249. Farfán, N. *et al.* The transcriptional factor ZEB1 represses Syndecan 1 expression in prostate cancer. *Sci. Rep.* **8**, 11467 (2018).
250. Baghy, K., Tátrai, P., Regős, E. & Kovalszky, I. Proteoglycans in liver cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 379–393 (2016).
251. Vicente, C. M. *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Colorectal Cancer. *Anal. Cell. Pathol. Amst.* **2018**, 8389595 (2018).
252. Chute, C. *et al.* Syndecan-1 induction in lung microenvironment supports the establishment of breast tumor metastases. *Breast Cancer Res. BCR* **20**, 66 (2018).
253. Ke, P.-Y. & Chen, S. S.-L. Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases. *Viruses* **4**, 2251–2290 (2012).
254. Valadão, A. L. C., Aguiar, R. S. & de Arruda, L. B. Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
255. Kuhn, J., Gressner, O. A., Götting, C., Gressner, A. M. & Kleesiek, K. Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **409**, 123–126 (2009).
256. Abdelwahab, K. S. & Ahmed Said, Z. N. Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World J. Gastroenterol.* **22**, 862–873 (2016).
257. Krumm, S. A. & Doores, K. J. Targeting Glycans on Human Pathogens for Vaccine Design. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2018). doi:10.1007/82_2018_103
258. Baumert, T. F., Jühling, F., Ono, A. & Hoshida, Y. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC Med.* **15**, (2017).
259. Goossens, N. & Hoshida, Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* **21**, 105–114 (2015).
260. Axley, P., Ahmed, Z., Ravi, S. & Singal, A. K. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **6**, 79–84 (2018).

261. Sethi, M. K., Buettner, F. F. R., Ashikov, A. & Bakker, H. In vitro assays of orphan glycosyltransferases and their application to identify Notch xylosyltransferases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1022**, 307–320 (2013).
262. Lee, T. V. *et al.* Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet.* **9**, e1003547 (2013).

Remerciements

Je souhaite remercier le Pr Fabien Zoulim pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie les Dr Nathalie Théret et Jean-Christophe Meunier d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, et pour leurs évaluations critiques et constructives de mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Pr Dulce Papy-Garcia et le Dr Serge Manié d'avoir accepté d'examiner mon travail. Merci à toutes ces personnes pour le temps et l'énergie qu'elles ont consacré à la lecture, l'évaluation et la critique de mon travail.

Je tiens également à remercier les Dr Rosita Accardi et Bruno Clément, membres de mon comité de suivi de thèse, qui ont suivi avec intérêt et bienveillance l'avancement de mes travaux pendant 4 ans. Chacune de nos réunions annuelles ont permis de critiquer constructivement mon travail pour recentrer les problématiques, discuter des difficultés et finalement améliorer l'évolution de cette recherche. Merci pour votre investissement dans mon travail.

Je remercie également tous les collaborateurs qui ont grandement contribué à l'avancement de ce projet. Je remercie les Drs Romain Vivès et Hugues Lortat-Jacob à Grenoble pour leur aide sur les analyses de sucres et pour nous avoir introduites Eve et moi dans le monde de la glycobiochimie. Je remercie le Pr Joachim Kuhn et son équipe à Bad Oeynhausen pour les tests d'activité enzymatique et nos nombreuses interactions scientifiques fructueuses. Je remercie également l'équipe du Pr Dulce Papy-Garcia et son collaborateur le Dr Minh Bao Huynh à Paris, pour l'analyse des GAG et les nombreux échanges que nous avons eus autour de nos résultats. Je remercie l'équipe du Pr Carlito Lebrilla à l'université de Californie pour leur dosage des sucres par leur technique d'UHPLC. Je remercie également le Pr Martine Laville à l'Hôpital Lyon Sud pour nous avoir reçues Eve et moi afin de discuter du dosage colorimétrique du xylose. Je remercie les Drs Claudia Montaldo et Andrea Baiocchi à Rome pour les échantillons de foie décellularisés qu'elles nous ont gracieusement fournis pour notre étude. Je remercie également les Drs Romain Parent et Julie Lucifora au sein de notre laboratoire pour les discussions scientifiques constructives et l'accès aux échantillons de différentes expériences d'infection, exploités dans ce travail. Je remercie l'équipe du Dr Nicole Pavo à Maison-Alfort pour leur aide sur les infections HEV. Je remercie également le Dr Nicole Thomasset, chercheur retraitée de l'hôpital neurologique de Lyon, et Michelina Plateroti du CRCL pour leur contribution précieuse à la partie de notre projet portant sur la voie Notch.

Enfin, je remercie ma directrice de thèse (et tellement plus que ça), Eve, pour sa bienveillance à mon égard depuis mon stage de première année de master en 2013. A l'issue de mon premier entretien avec toi, l'image du mentor que tu es devenue pour moi par la suite est née dans mon esprit. Merci à toi pour la formation scientifique rigoureuse et exigeante que tu m'as prodiguée, tes excellents conseils, ton grand soutien moral de tous les instants et les crèmes caramel. Merci de m'avoir toujours considérée comme une collaboratrice à part entière et de m'avoir poussée à me dépasser.

Un grand merci aux « annexiens » pour les rires, les pauses et surtout la grande solidarité dont vous avez su faire preuve durant ces 4 années. Je remercie en particulier Romain pour sa tolérance face au harcèlement sexuel et Suzanne, lumière de mes jours et mes nuits. A Mams et Brioux, qui malgré un début houleux ou un caractère bien trempé ont su se faire une place dans mon cœur. Une pensée particulièrement affective également pour mes colocataires de bureau : Hélène et ses potions magiques sans qui l'Amour est dans le pré ne serait pas aussi passionnant, Héloïse, princesse des licornes et rayon de soleil en chef, Audrey et sa capacité à toujours relativiser, Laura, que j'aimerai toujours faire pleurer de rire en chantant Mike Brant parce que son rire est le meilleur antidépresseur, et Ludo, mon compagnon d'armes et voleur d'agrafeuse invétéré.

Je tiens à remercier mes colocataires du labo HCV, en particulier Jennifer M, Léa et Sarah pour les coups de main innombrables, les discussions plus ou moins constructives mais toujours bienveillantes,

et les coups de gueules, parfois. Je ne saurais ainsi faire une meilleure transition pour remercier Boyan, roi de la râle au grand cœur et, bien que jamais bien motivé pour le ménage du P3, toujours prêt à discuter de mes résultats ou prendre un café. Sans son aide, ce travail de thèse ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Je remercie enfin tous mes stagiaires, qui ont tous participé à la progression de ce projet et que j'espère ne pas avoir traumatisés.

Il me semble important ici de mentionner quelques belles rencontres faites au labo qui toutes laissent une trace dans ma vie. Merci donc à Mirna, l'élégance libanaise incarnée et compagne de cocktails au Florian et à Jennifer B et Solène, mes premières camarades que j'ai toujours beaucoup de plaisir à retrouver.

Pour terminer avec l'équipe du CAT, je tiens à remercier quelques personnes qui se sont illustrées par leur bienveillance scientifique et personnelle à mon égard au cours de ces années de thèse. Un grand merci à Marie-Laure P pour ses conseils toujours avisés, son aide pour les biopsies et son amour partagé du Cerdon, à Anna pour son affection sans faille, en particulier dans les moments difficiles, et Birke pour son soutien scientifique et matériel qui a porté le projet le plus loin possible. Merci aussi pour la porte du bureau toujours ouverte et les discussions pas du tout scientifiques. Je remercie également Isabelle, Françoise, Pascale, Claude, Maud et Philippe pour leur incroyable gentillesse. Enfin, un grand merci à Marie-Agnès et Christophe pour leurs compétences de gestion hors du commun qui sauvent le labo (ou juste les étudiants...) dans les moments de crise, et la chaleur dont ils savent faire preuve.

Je remercie ici ma deuxième famille professionnelle, toute l'équipe de biologie cellulaire à l'université. Merci d'avoir été des collègues patients, pédagogues et d'une gentillesse à toute épreuve. Je remercie particulièrement Dominique B, Dominique LG, Emilie, Elise et Jérôme pour toutes les connaissances et les valeurs qu'ils m'ont transmises. A Christelle, merci pour ta remarquable bienveillance à mon égard et la foi que tu as en moi. J'espère en être à la hauteur.

Il est maintenant temps de faire le tour de ceux dont l'amitié est un soutien de tous les instants, qui ont été les bras dans lesquels j'ai pu me réfugier quand les journées étaient dures.

A Arthur, Azélie, Camille, Gérald et Johanna, un grand merci pour les nombreuses soirées aux thèmes aussi variés que Game of Thrones, débats pour les présidentielles ou plus simplement parce que c'est samedi soir. Que ce soit individuellement ou en groupe les moments passés avec vous sont toujours exceptionnels.

Dans le cercle des anciens, je veux remercier Marie-Laure G pour me faire toujours autant rire depuis 17 ans. Oui 17 ans, tu as bien lu, que tu es le collier de perles autour de mon cou, le serre-tête sur mon crâne et le Playboy sous mon lit. A Cécile, matheuse certifiée et biologiste qui s'ignore, partenaire des coups de gueules depuis les cours de SVT au lycée, merci pour tout cet amour que tu caches sous une belle dose de cynisme. A mon Ange, grand malade s'il en est, ta folie n'a d'équivalent que ton cœur et ta loyauté, et pour ces trois grandes qualités, merci.

Un éternel merci à Halima, ma compagne de guerre aussi bien dans les ténèbres que la lumière, thé à la menthe à la ceinture et de l'amour plein les bras. Quel bonheur de t'avoir rencontrée.

J'en viens maintenant aux rencontres universitaires ou de labo hors CAT. Un grand merci à Franck qui, même en manquant de jugement dans ses choix de ville, reste l'un des biologistes que j'admire le plus. A Nicolas, enfant prodige pas tout à fait câblé comme tout le monde qui force mon admiration et mon respect depuis nos dernières années de fac, et qui m'a appris à ne pas me prendre trop au sérieux. A Angélique, merci pour ta gentillesse, ton humanité et les séances de piscine qui m'ont tant fait rire. Merci également à Valentin auprès de qui je retrouve (presque) toujours mon calme et qui m'inonde d'affection depuis toutes ces années. Je remercie également un peu en vrac quelques belles rencontres comme Morgane, Monika, Marie ou encore Chloé pour les conseils avisés et les tranches de rigolade. Finalement, je remercie mon camarade expatrié Nathan pour les comparaisons désobligeantes entre nos

conditions de travail, les photos d'immunostaining et de FACS, et la certitude hilarante que tu finiras écrasé par 300 kgs de fonte.

Je tiens à remercier ici des proches, entre amis et famille, pour leur soutien direct ou indirect ces dernières années, en particulier dans les épreuves les plus terribles. Un grand merci à Hélène, Bernadette et Carine pour l'amour que vous portez à ma famille depuis toutes ces années. Merci également au clan Bourges pour l'inaltérable amitié qui nous lie depuis toujours et votre soutien de tous les instants. Je remercie particulièrement Laurence, sans qui finalement je ne serai même pas là aujourd'hui pour soutenir ma thèse !

Enfin, je remercie les deux femmes de ma vie, qui m'ont littéralement suivie au bout du monde dans un projet né autour de bières rouges sur une terrasse ensoleillée. A Laure, la perle des Antilles, merci d'entretenir depuis toutes ces années mon côté geek et de me ramener des avocats. A Van, you are my lobster, thank you for everything, especially the banh baos.

Le plus dur à présent est de remercier ma famille. Qu'il est difficile de mettre des mots sur des choses que l'on a déjà du mal à ressentir tant elles sont fortes. Ma famille a toujours été le pilier principal de ma vie, et je ne serai jamais allée aussi loin sans eux.

Je veux tout d'abord remercier Odile, sœur de cœur de mon père, et sa tribu Jean-Luc, Mona, Lili et ma petite Lucie. Chaque voyage en Bretagne dans le berceau de notre famille est pour moi un retour aux sources. Je vous remercie pour tout votre amour, votre immense générosité et les rires qui fusent à chacune de nos retrouvailles.

A ma tante, voisine et confidente Cécile qui fait preuve d'un courage et d'une combativité hors du commun, merci pour tout ton soutien ces dernières années, tout l'amour et les conseils que tu m'as donnés, et merci d'avoir si fortement contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. Un grand merci à ta famille qui est aussi un peu la mienne et avec laquelle j'aime toujours passer du temps. A ma cousine Albanne, qui a longtemps été mon modèle de réussite, merci pour ton accueil chaleureux dans ta petite famille lors de mes visites. A ma grand-mère Annette, qui pensait que tout était possible par les études, je la remercie de m'avoir accueillie et aimée comme son enfant mes premières années d'université à Lyon. Cette thèse lui est partiellement dédiée.

Je remercie mes frères et sœur Anne-Gaëlle, François et Hugo pour leur soutien et leur amour de tous les jours, les weekends, les vacances. A ma sœur Mamba, merci pour toutes ces parenthèses de bien-être dans le sud avec ta famille et la motivation pour aller courir. A François, merci pour les champignons dès que vient la pluie, ta cuisine réconfortante et les références à Elie Kakou. A Hugo, colocataire bordélique qui se soigne, merci pour le champagne quand le moral est bas, pour ton humour qui m'exaspère autant qu'il me fait rire et ton si grand cœur de porc-épic.

A mon père qui, à défaut de m'avoir vue faire Polytechnique comme il m'en parlait petite fille, m'a toujours soutenue dans mes études universitaires et poussée à faire un doctorat. Je le remercie d'avoir absolument toujours cru en moi, de m'avoir rendue forte dans l'adversité et de m'avoir guidée dans mes choix. Je le remercie d'avoir accompagné tout cet encouragement à la réussite de son amour le plus profond. Ce manuscrit lui est également dédié.

Enfin, je remercie ma mère. Je la remercie d'être mon modèle depuis que je suis enfant, puisque ce modèle m'a poussée à en arriver là. Elle est mon modèle de courage, de droiture, d'humilité et d'humanité. Je la remercie pour ses encouragements, ses nombreuses inquiétudes, et son amour inconditionnel. Je la remercie de m'avoir amenée jusqu'ici et de ne m'avoir jamais lâchée malgré toutes les épreuves effroyables à traverser. J'espère pouvoir toujours lui procurer un sentiment de sécurité contre tous les José Pavy de ce monde et lui assurer que le GIGN ne sera jamais à sa porte.