

Effet de la concentration en oxygène sur l'expression et la réplication virale : notion de virus « aérobique » et « anaérobique »

Sylvie Pillet, Claude Capron, Frédéric Morinet

Laboratoire des agents infectieux et hygiène, CHU de Saint-Etienne et GIMAP EA 3064, Faculté de Médecine de Saint-Etienne

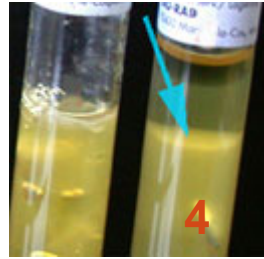
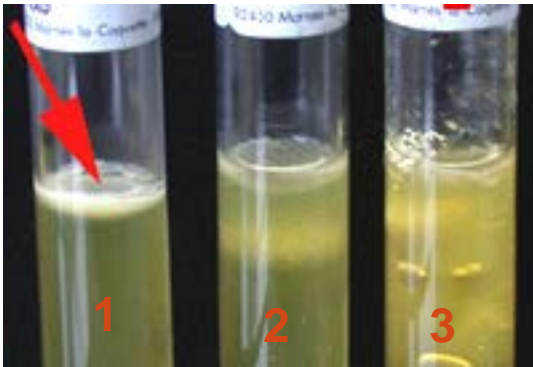
Université de Saint-Quentin en Yvelines et Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie- Hôpital Ambroise Paré, Paris

Université Paris VII et Pôle Biologie-Pathologie-Physiologie (B2P), GH Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal, Paris

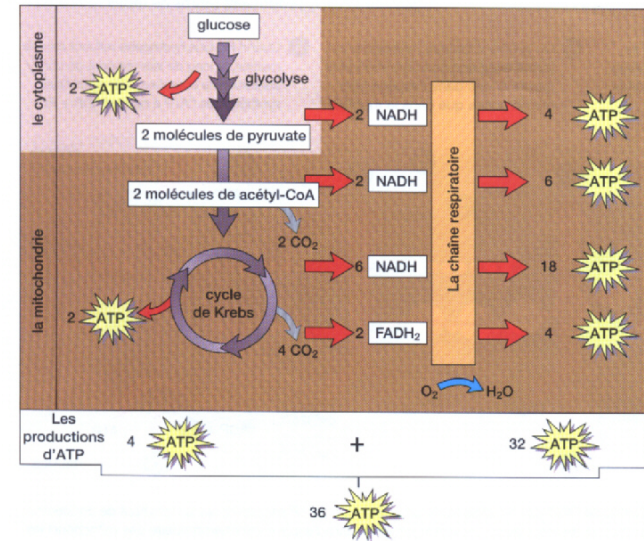


Bactéries aérobies et anaérobies

- Caractère variable : utilisation de l'oxygène pour réoxyder la chaîne respiratoire



<http://www.microbes-edu.org>



<http://pta.nbed.nb.ca/bio>

aérobie

anaérobie

Classification des bactéries

- Aérobies strictes (1)
- Aérobies-anaérobies facultatives (2, 3)
- Anaérobies strictes (4)

➤ Conditions de culture des bactéries

- Jarres en anaérobiose pour les anaérobies



Et pour les virus?



- Virus = parasite intracellulaire obligatoire
- La multiplication des virus est conditionnée par l'environnement intracellulaire
- Contrôle de nombreux facteurs associés à la culture cellulaire
 - Type cellulaire
 - Concentration en nutriments (glucose, acides aminés,...), hormones, facteurs de croissance
 - Maintien du pH (tampon CO_2 /bicarbonates)
 - Etuve avec 20% d' O_2 (niveau atmosphérique)
- Notion de « virus aérobie » et de « virus anaérobie » :
 - Développement ou survie des cellules en fonction des conditions d'oxygénation
 - Utilisation de facteurs intracellulaires régulés par l'oxygène
 - *In vitro* mais surtout *in vivo*

Plan

- Le facteur majeur de réponse à l'hypoxie : HIF
- Virus et hypoxie : comment l'histoire a débuté au laboratoire de Virologie de Saint-Louis?
 - L'infection par le parvovirus B19 *in vitro* en 2000
- Autres virus dont l'expression est régulée par l'oxygène
 - Nombreux et en particulier:
 - HIV
 - Virus de l'hépatite C
 - Virus de l'hépatite B
 - Virus Epstein-Barr
 - Virus herpes 8 (HHV-8)
- Conséquences diagnostiques, thérapeutiques et taxonomiques

Découverte du facteur HIF

Séjour en altitude



Restriction prolongée en oxygène



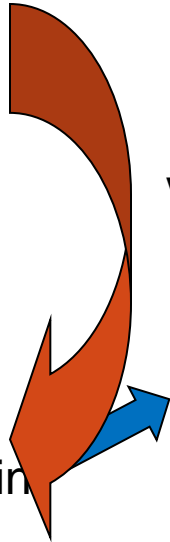
Nécessité d'adaptation



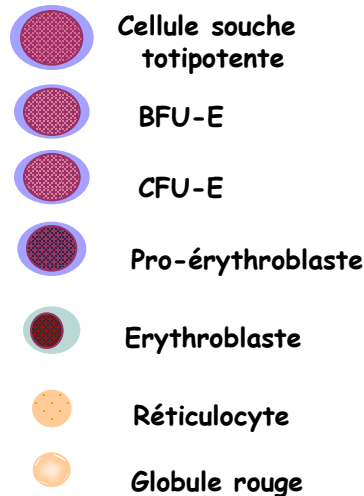
Synthèse d'Epo par le rein



Prolifération et différenciation des précurseurs érythroïdes



Voie HIF



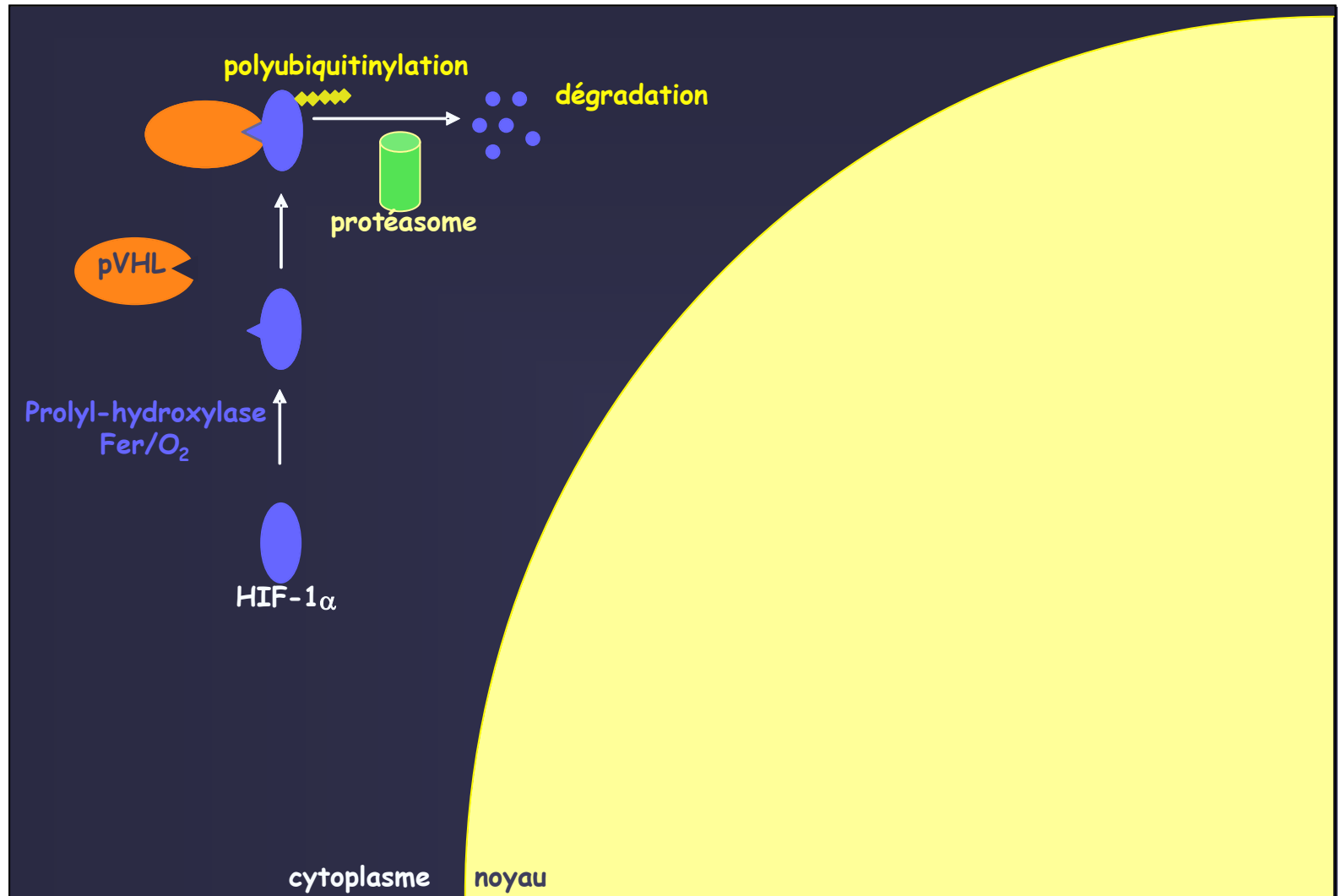
Production de GR



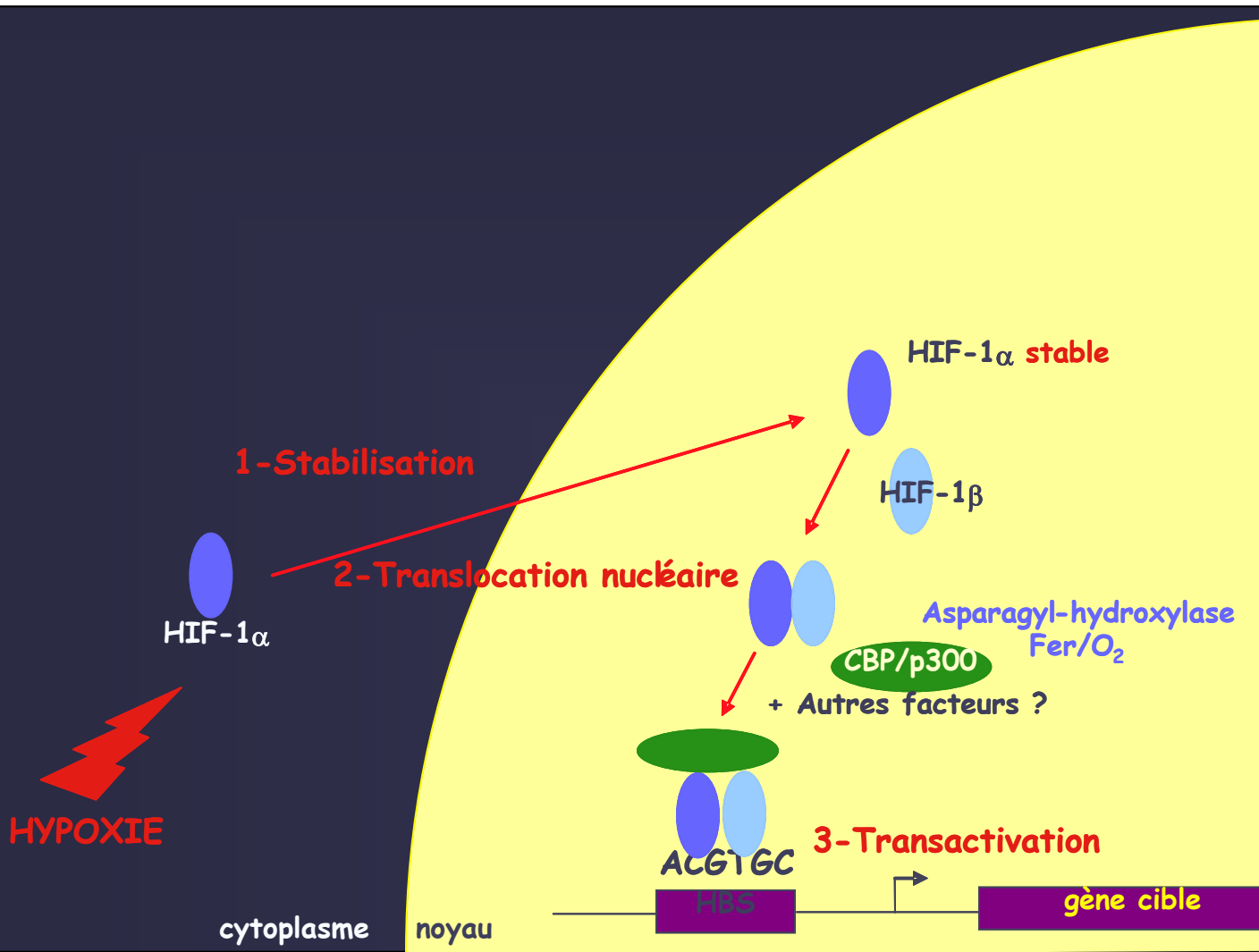
Augmentation des apports en oxygène

Voie d'activation des gènes par l'hypoxie

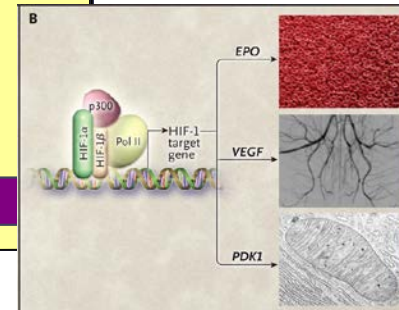
En présence d'oxygène



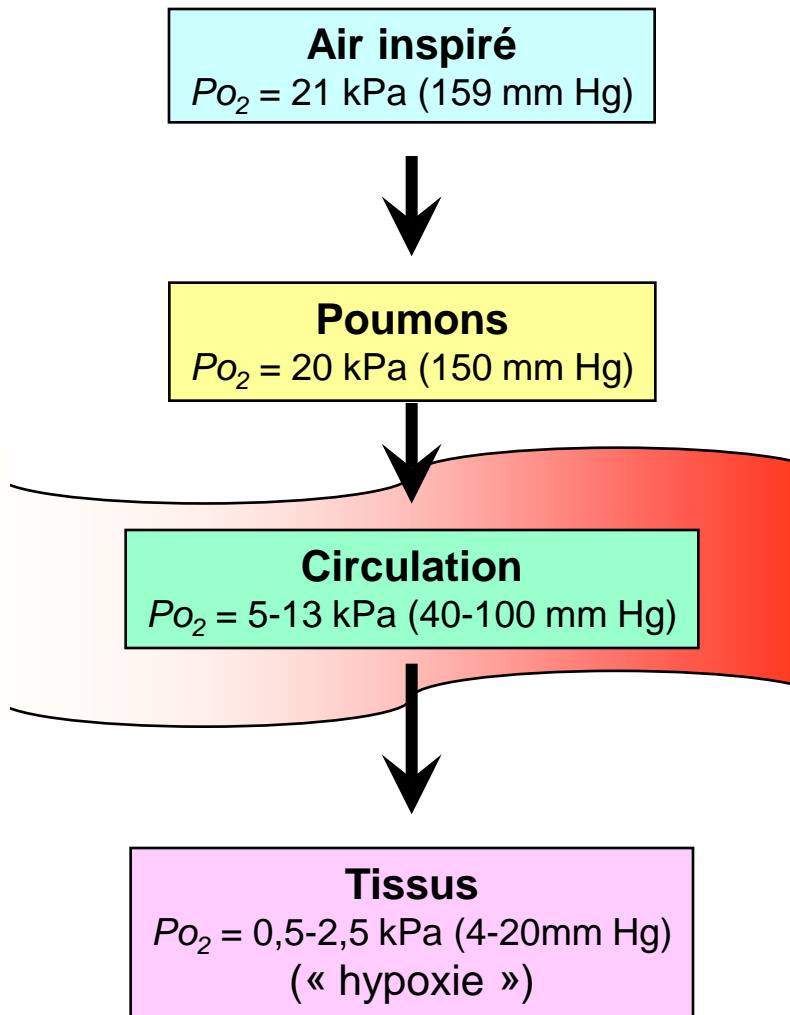
Voie d'activation des gènes par l'hypoxie



Erythropoïèse
Angiogénèse
Glycolyse anaérobie



Rôle physiologique et pathologique de l'hypoxie et de HIF

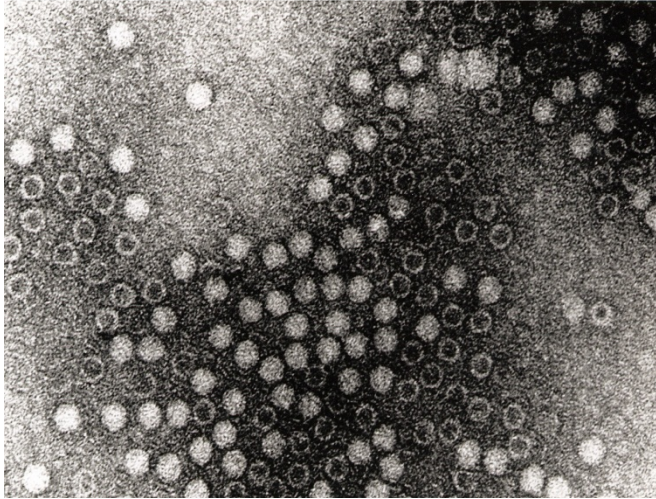


- La concentration tissulaire *in vivo* en oxygène est $< 5\%$
 - « hypoxie » par rapport à 20% d' O_2 mais normoxie physiologique¹
 - La culture cellulaire est effectuée à 20%!
- Le développement du placenta et du fœtus se font en hypoxie au 1^{er} trimestre²
- La concentration en O_2 au sein des tumeurs est très faible ($< 1\%$)³
 - HIF = cible thérapeutique anti-cancéreuse

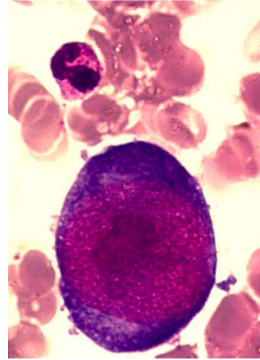
Comment l'histoire a commencé?

L'infection par le parvovirus B19 au laboratoire en 2000

Le parvovirus B19 (érythrovirus B19)



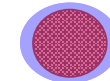
Laboratoire de Virologie, Hôpital Saint Louis, Paris



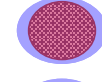
Frottis de moelle osseuse de patient infecté par le B19

Différenciation

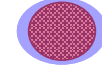
Zone médullaire



Cellule souche totipotente

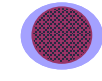


BFU-E



CFU-E

Cibles du B19



Pro-érythroblaste



Erythroblaste



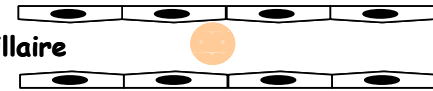
Réticulocyte

Zone corticale

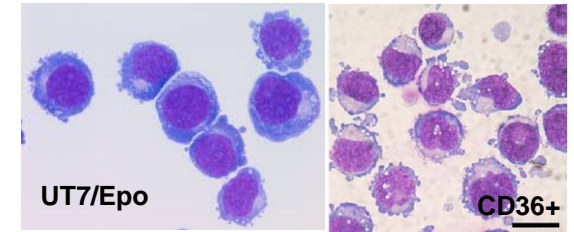


Globule rouge

Capillaire



Culture du parvovirus B19 au laboratoire



• Cellules

- Lignée UT7 cultivée avec Epo
- Cellules primaires CD34+ issues de cytophérèse (collaboration avec Institut Cochin) et cultivées avec Epo (cellules CD36+)

➤ Culture non effectuée en routine

• Infection peu productive

- Lignée UT7/Epo :
 - Facile d'accès (lignée)
 - Expression de la protéine NS1 uniquement (pas de protéines de capsid ni de particules virales)^{1, 2}
- Cellules primaires CD36+ : cycle complet mais très peu productif
- Source de virus = sérum de patient en phase virémique 10^{10} à 10^{12} particules virales/ml

• Tests de divers agents chimiques pour augmenter l'infectivité du B19 *in vitro*

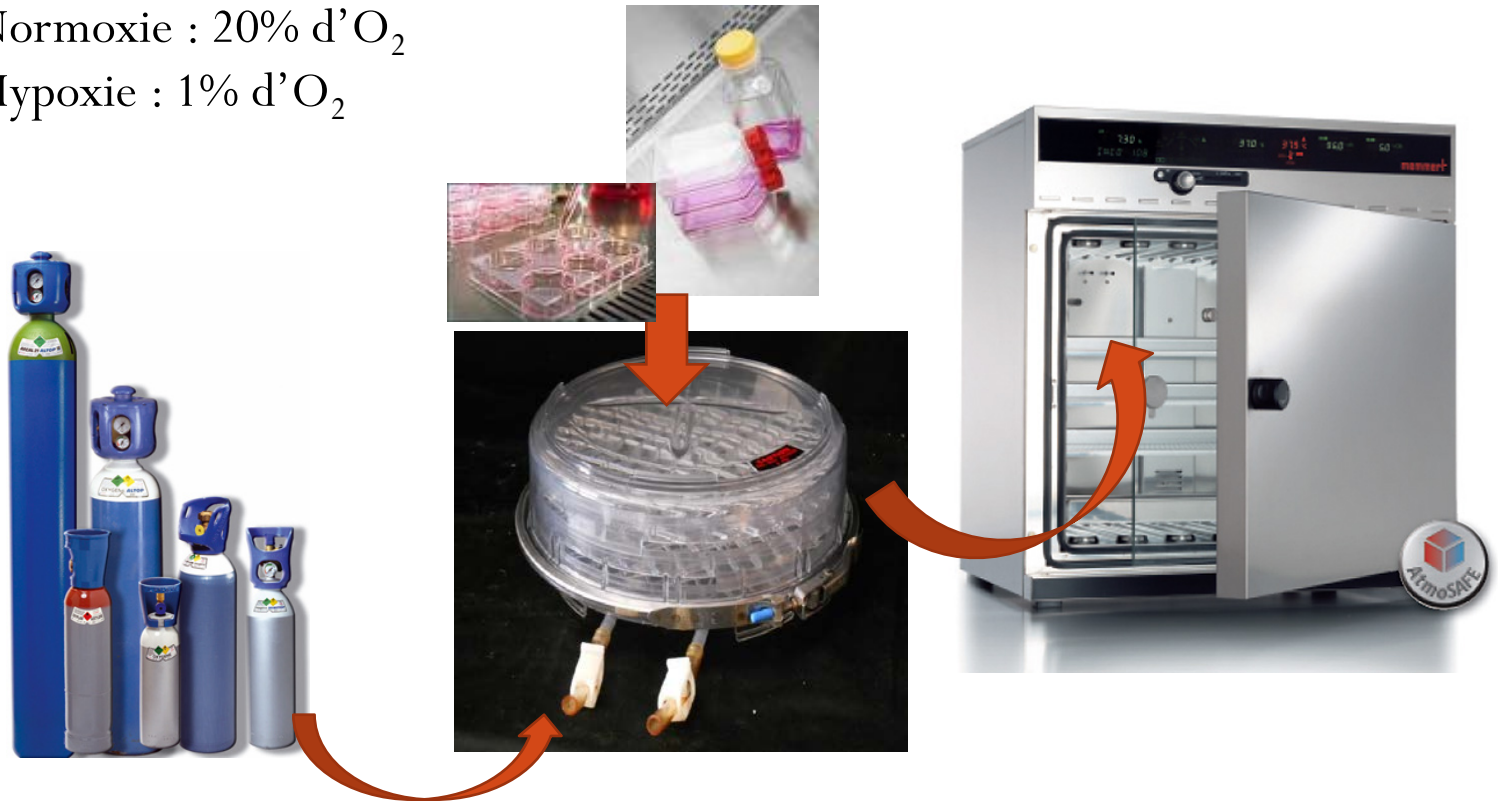
- Chlorure de cobalt (stabilise HIF) : quelques cellules sur 200 000 expriment les protéines de capsid³
 - Culture des UT7/Epo en hypoxie : quelques cellules positives³
 - Première piste pour augmenter la permissivité des cellules au B19
 - Et sur les cellules primaires CD36?

¹ Leruez et coll, 1994 ; ² Pallier et coll., 1997 ; ³ Morinet, données personnelles

Stratégie

- Conditions d'infection :
 - Cellules primaires érythroïdes CD36+
 - Souches virales issues de patients en phase virémique

- Conditions de culture :
 - Normoxie : 20% d'O₂
 - Hypoxie : 1% d'O₂

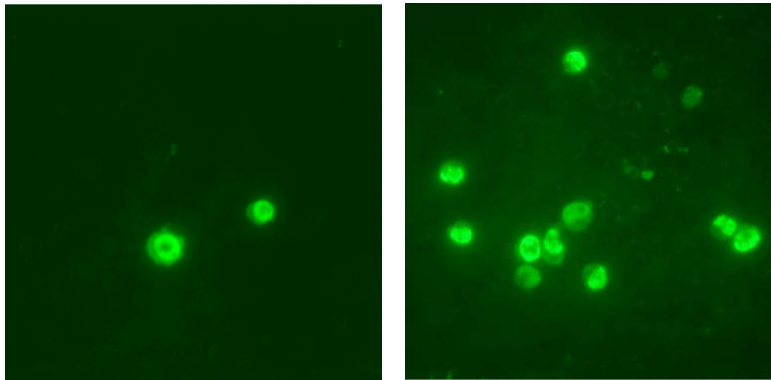


L'hypoxie augmente l'expression du B19 dans les progéniteurs érythroïdes infectés *in vitro*

Cellules infectées
en normoxie

Cellules infectées
en hypoxie

VP1/2



Sonde B19

VP1
NS et VP2

Petits ARN

NI Infectées
N H

Marqueur
kb

6,58

4,98

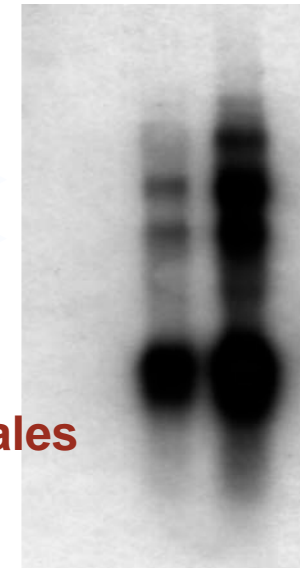
2,60

1,90

0,95

0,62

0,28



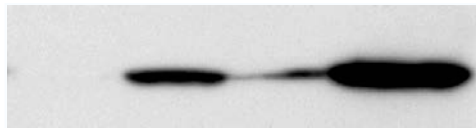
et augmentation x8 du nombre de particules virales

24h

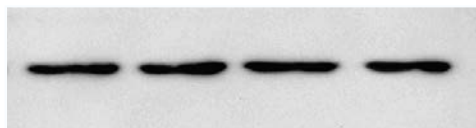
48h

N H N H

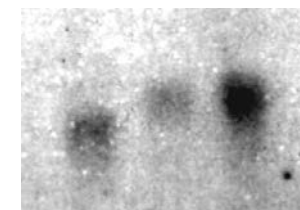
VP2



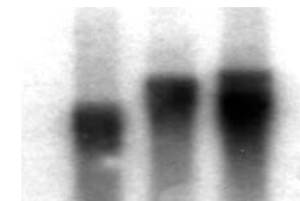
actine



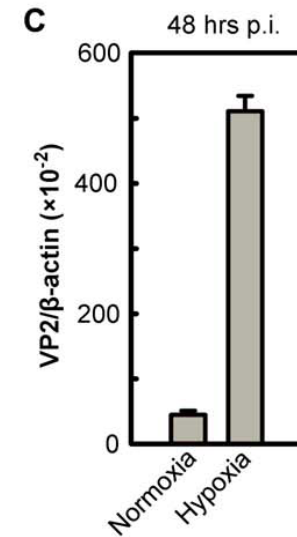
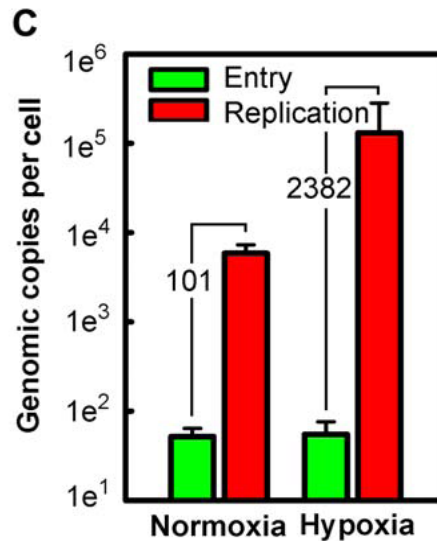
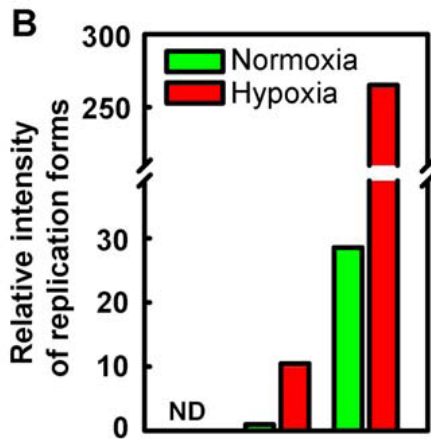
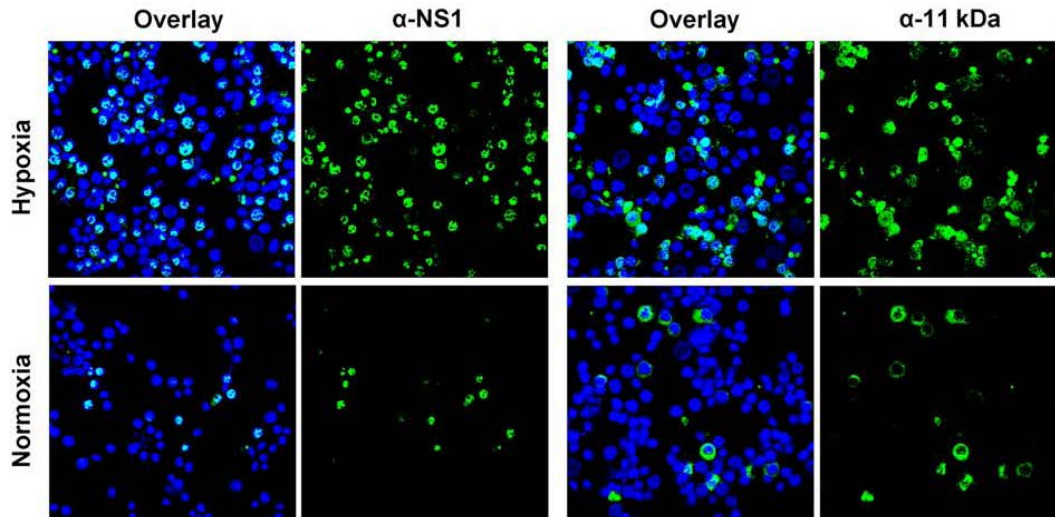
Sonde aldolase



Sonde 28S



Expression et réplication du B19 en hypoxie - confirmation



En Hypoxie:

↗ du nombre de cellules infectées

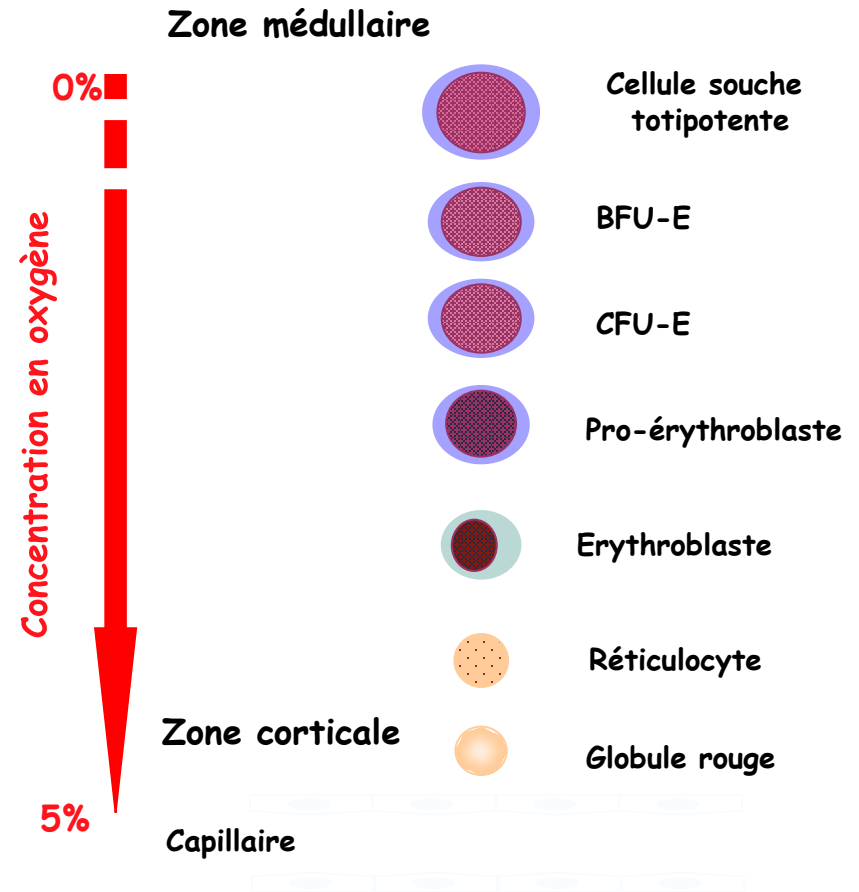
↗ expression des protéines

↗ réplication intracellulaire

Relevance clinique

- Faible concentration en O_2 dans la moelle osseuse

⇒ Tropisme érythroïde du B19?



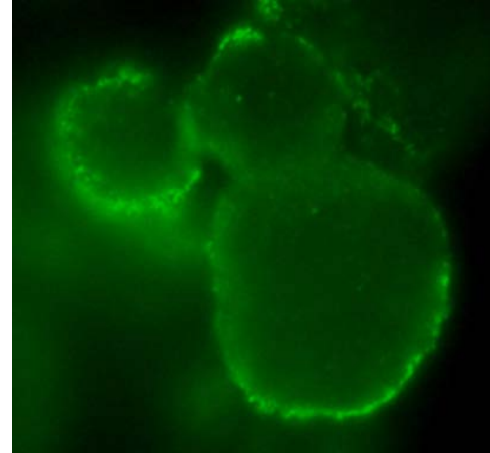
Infection des progéniteurs mégacaryocytaires

- Infections à B19 souvent associées à des thrombopénies
 - Toxicité directe du virus?

Normoxie



Hypoxie



C. Capron et F. Morinet, 2014

Et les autres virus?

Travaux pionniers-virus humains

- 1961 : influence de l'oxygène sur la croissance des virus¹
 - Cellules embryonnaires de poulet cultivées en agar : observation des plages de lyse après infection par le virus Chikungunya
- Revue par Ebbesen et Zachar en 1998² ; rôle de la production d'interféron
- Influenza :
 - Multiplication dans l'arbre respiratoire : forte concentration en O₂
 - Pas de multiplication *in vitro* si anaérobiose³
 - Réplication moindre *in vivo* chez la souris en hypoxie⁴
 - Modèle de virus « aérobic »

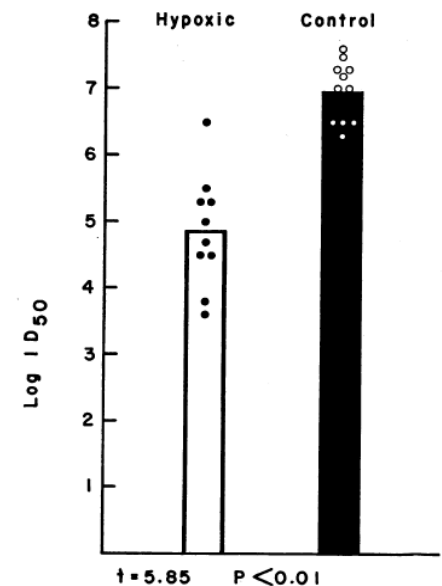
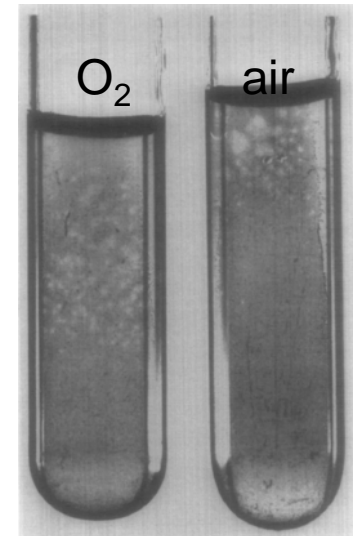


FIG. 1. The growth of influenza virus in hypoxic and control mice after 15 hr.

Virus et Hypoxie

- **Virus dont l'expression est régulée par l'oxygène**

- Activation par l'hypoxie

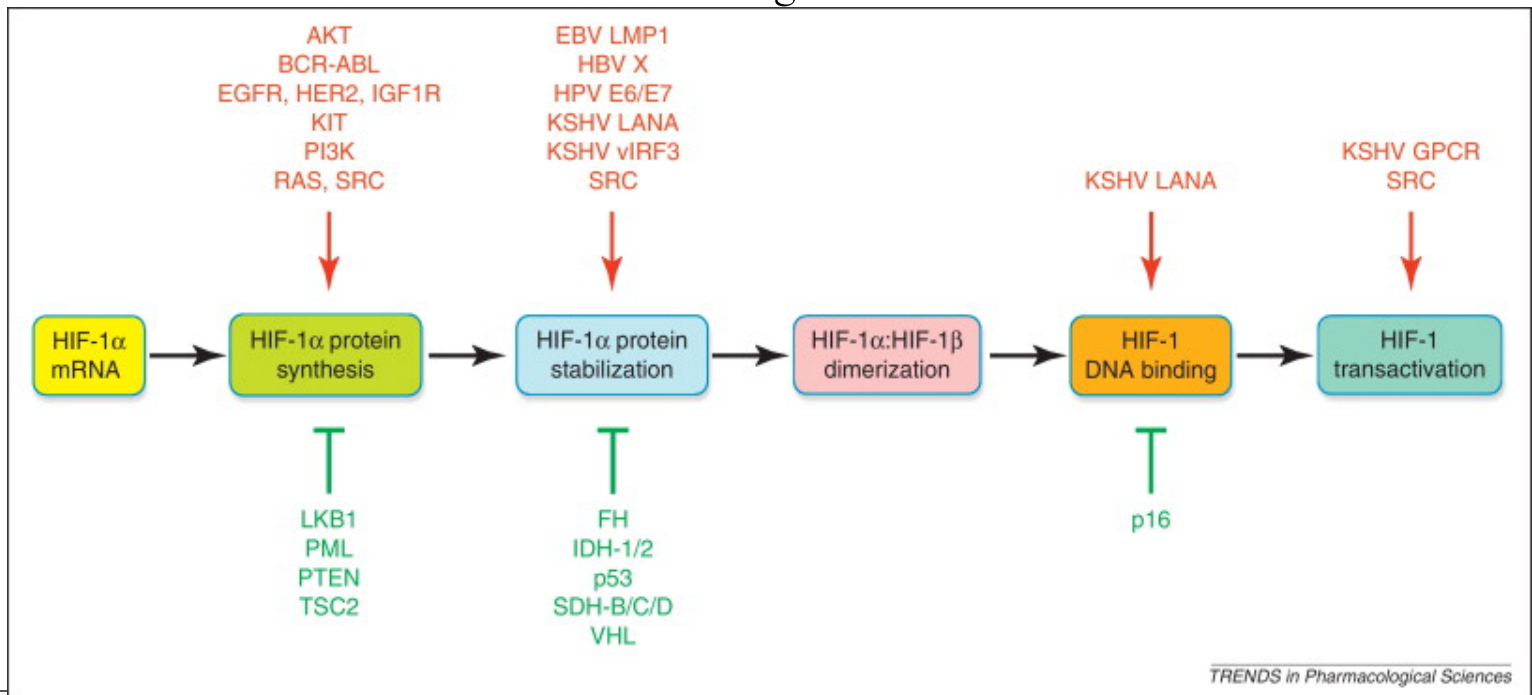
- Parvovirus B19
- HIV
- Virus de l'hépatite C
- Virus herpes 8 (HHV-8)

- Inhibition par l'hypoxie

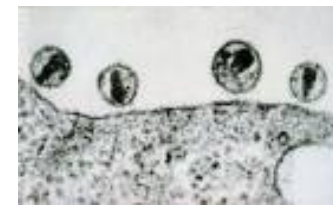
- Adénovirus
- Virus grippaux

- **Nombreux virus interfèrent avec la voie HIF**

- Virus oncogènes



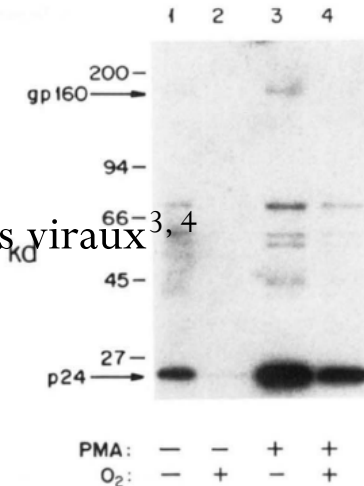
Virus HIV



- Régulation de son expression par l'oxygène :

- Modèles d'infection chronique et d'infection aiguë en lignée cellulaire¹
 - Culture en chambre anaérobie → ↑ expression des ARNm et des protéines du HIV
 - Potentialisation par PMA ; rôle de NFκB
- La concentration en O₂ dans le ganglion est de 4%
- Proposition de traitement par oxygène hyperbare² (échec)
- HIF interagit avec les LTR et induit la transcription des gènes viraux^{3,4}

- **Modèle de virus « anaérobie »**



- Interférence avec HIF

- vpr augmente la production de dérivés réactifs de l'oxygène (H₂O₂) ce qui induit l'accumulation d'HIF³
- **Le stress oxydatif induit par HIV agit comme une boucle de rétrocontrôle positif sur l'expression virale**
- tat et gp120 induisent un stress oxydatif et la production de PDGF⁵
- Manipulation du métabolisme cellulaire (enzymes de la glycolyse dans macrophage) : survie à long terme des macrophages infectés?⁶

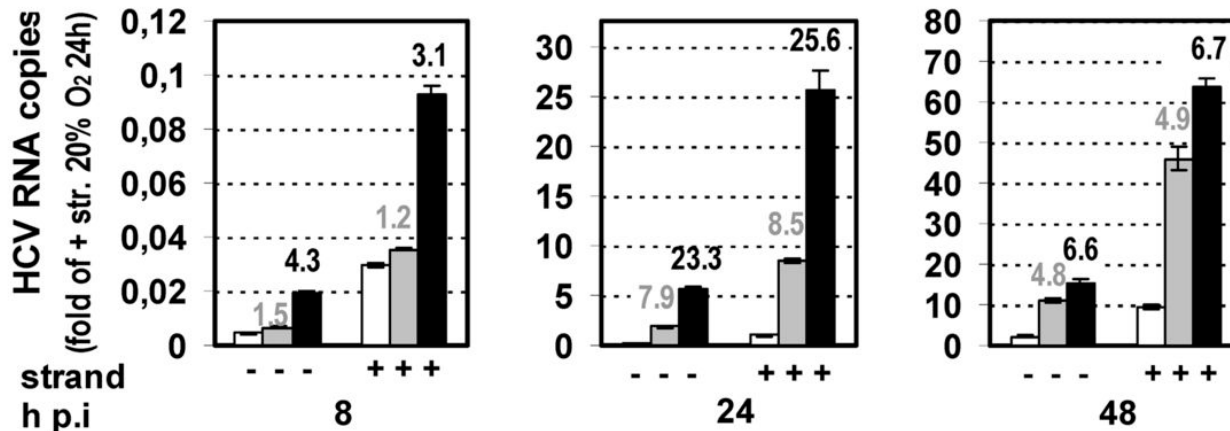
Interactions du virus de l'hépatite C avec l'hypoxie et HIF

- L'hypoxie augmente la réplication du virus *in vitro*¹
 - Virus difficilement cultivable → système de réplicons transfectés dans une lignée d'hépatocytes (Huh7.5)
 - Incubation à 3% d'O₂ augmente la réplication virale
 - Indépendant de HIF
 - Rôle de **B**

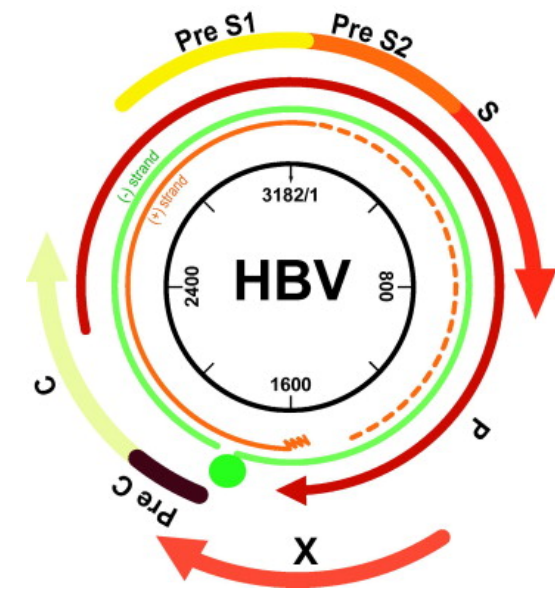
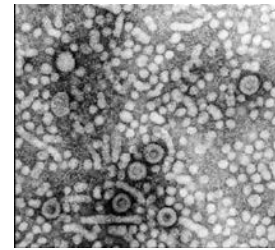
% O₂ □ 20→20 ◐ 20→3 ■ 3→3

Induction of JFH1/adpt1 RNA replication

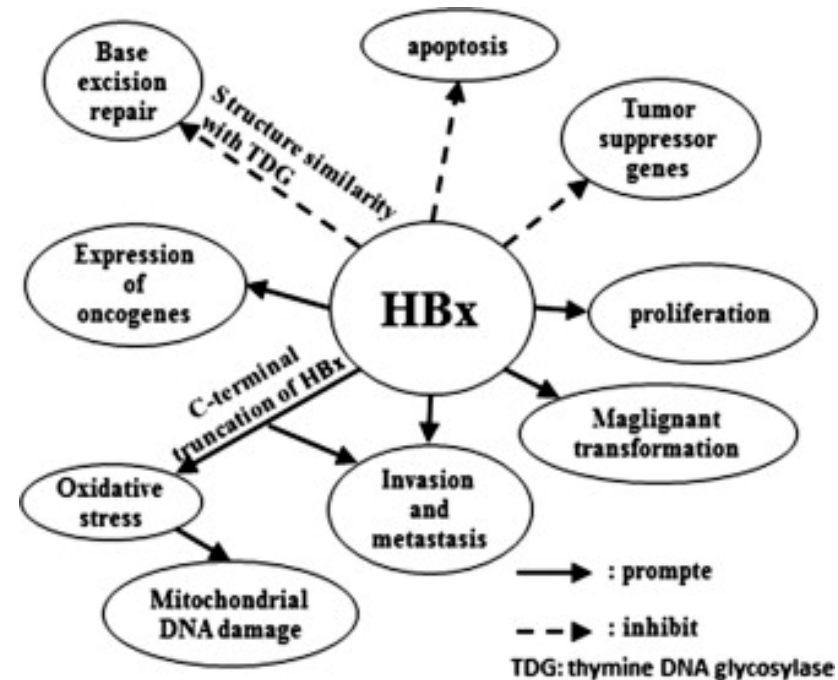
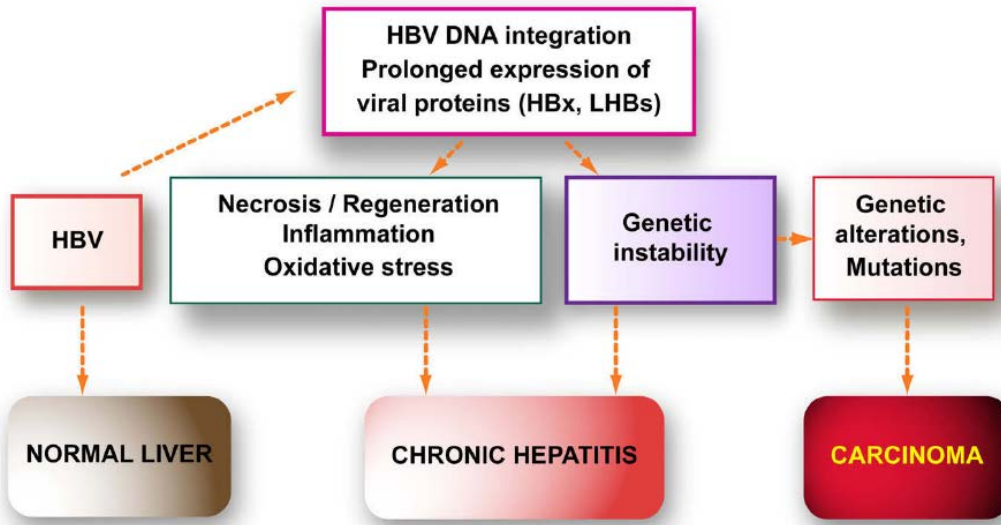
- HCV interagit avec le facteur B
- Protéine B stabilise le complexe de réplication
- Elle augmente la stabilité du complexe de réplication
- L'inhibition de B diminue la réplication virale



Virus de l'hépatite B et protéine oncogène HBx

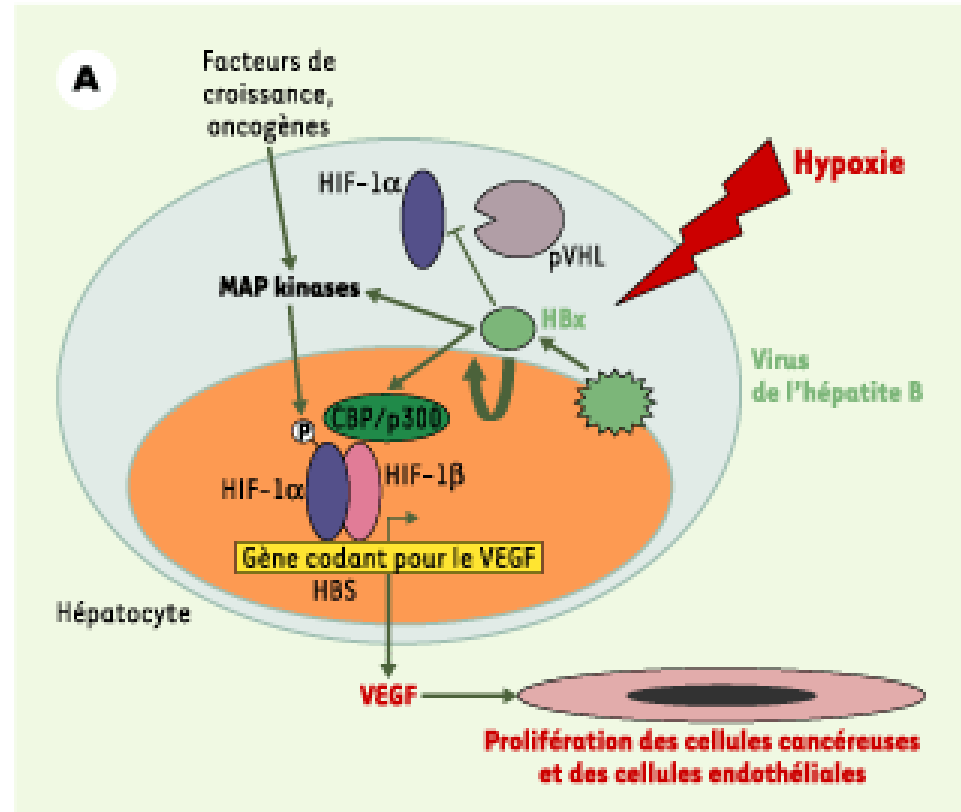


- Agent étiologique majeur du carcinome hépatocellulaire
- Réduction incidence par vaccination
- Antiviraux encore insuffisants
- Rôle majeur de l'inflammation / régénération du tissu hépatique
- Rôle de facteurs viraux : intégration ADN + protéine oncogène HBx

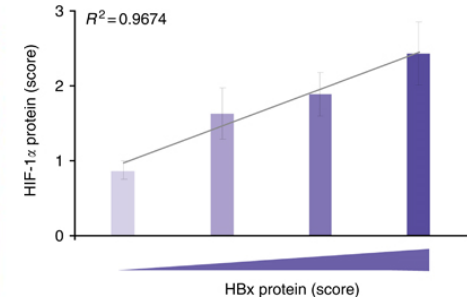
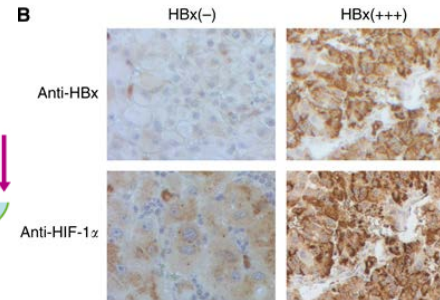
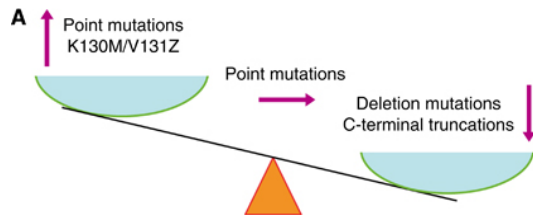
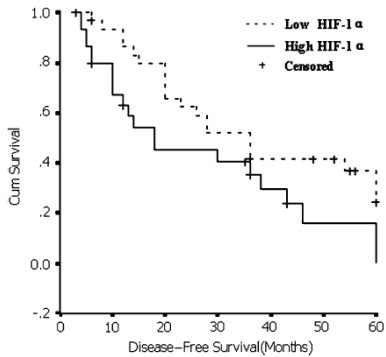


Interaction de HBx avec la voie HIF

- Activation des MAPK¹
 - ↗ stabilité de HIF
 - Phosphorylation de HIF
 - Augmentation du facteur pro-angiogénique VEGF
- Interaction avec HIF et inhibition liaison HIF/pVHL²
- ↗ expression MTA1 (*metastasis-associated protein 1*) et HDAC1 (*histone deacetylase*) par HBx → inhibition dégradation de HIF³
- Rôle de la région C-terminale de HBx
- Expression HIF associée à un mauvais pronostic⁴
- Mutants d'HBx avec potentiel activateur⁵

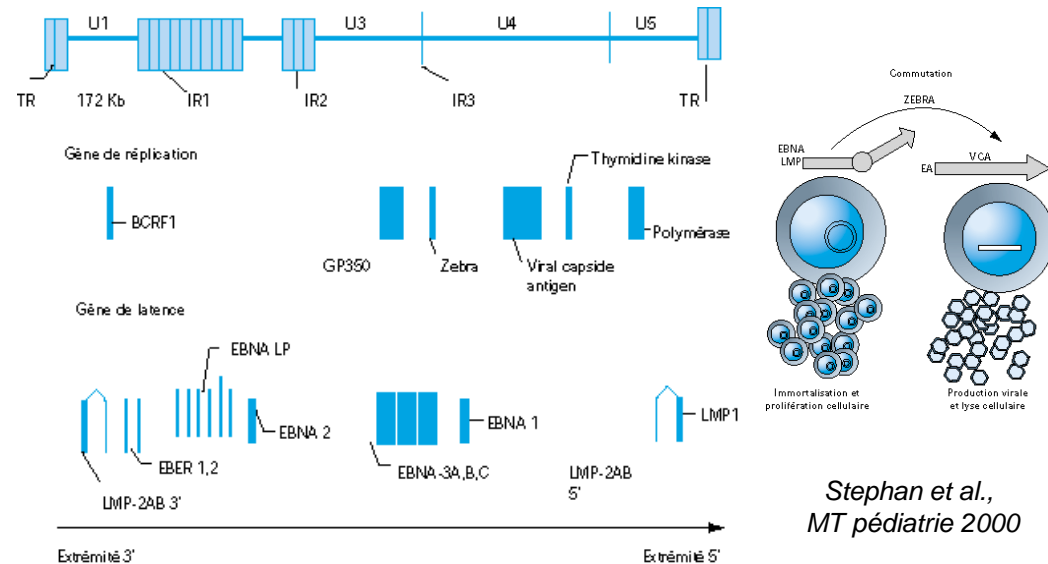


¹Yoo et al., *J Biol Chem* 2003 ; ²Moon et al. , *FASEB J* 2004 ;
³Yoo et al., *Oncogene* 2008 ; ⁴Xie et al., *Dig Dis Sci* 2008 ;
⁵Liu et al., *Br J Cancer* 2014



Virus Epstein-Barr (EBV) et voie HIF (1)

- Herpès virus
 - Cycle lytique
 - Rôle de la protéine ZEBRA
 - Latence à vie dans les lymphocytes B :
 - ADN épisomal
 - nombreuses protéines oncogènes
- Mononucléose infectieuse
- Virus oncogène
 - Rôle du virus+facteurs environnementaux
- Hypoxie
 - ↗ expression de ZEBRA et donc cycle lytique¹
 - ↗ réplication virale¹ via la fixation de HIF sur le promoteur Z du cycle lytique²
- HIF
 - Facteur de mauvais pronostic dans carcinome du nasopharynx³
 - Synthèse de VEGF
- EBNA
 - Inhibent hydroxylation et dégradation de HIF⁴



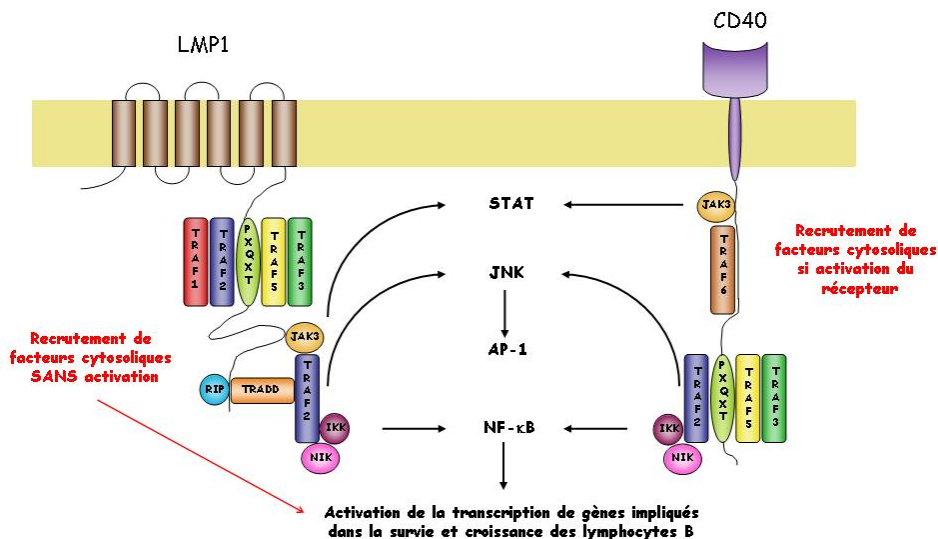
Stephan et al.,
MT pédiatrie 2000

¹Jiang et al., J Clin Virol 2006 ; ²Kenney and Mertz, Sem Cancer Biol 2014 ; ³Hui et al., Clin Cancer Res 2002 ; ⁴Kondo et al., Cancer 2006

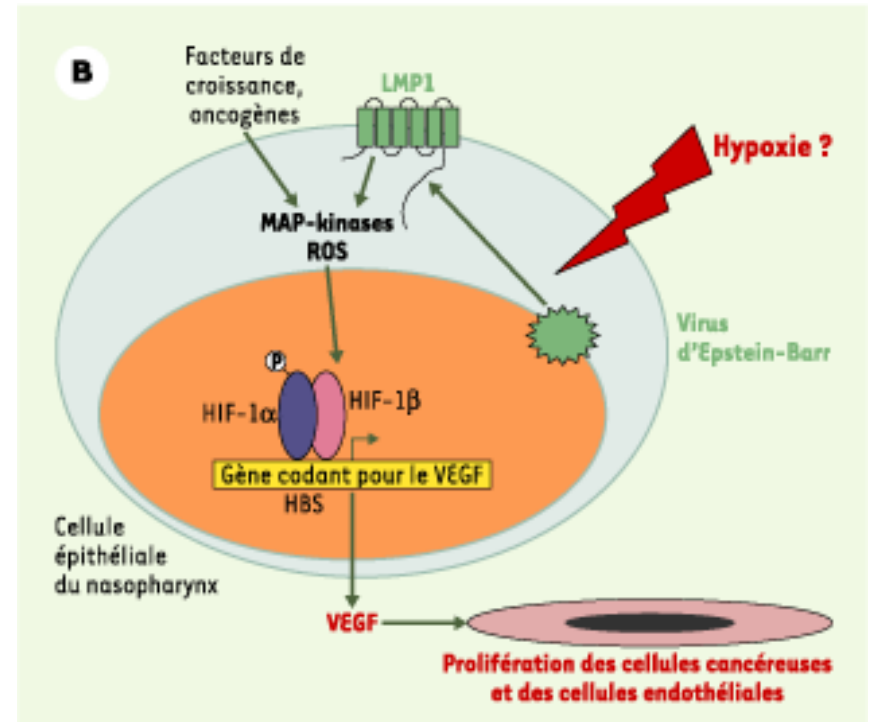
Virus Epstein-Barr (EBV) et voie HIF (2)

- LMP-1
 - Protéine membranaire de latence
 - Recrute les mêmes facteurs intracellulaires que CD40 SANS activation par un ligand
 - Impliquée dans la survie et la croissance des lymphocytes B
 - Induit l'expression de VEGF via l'activation de la cyclo-oxygénase¹
 - Induit l'expression de HIF¹ via les MAPK²
 - Stabilise HIF-1 α en empêchant sa dégradation³

Voies de signalisation activées par LMP1 et CD40

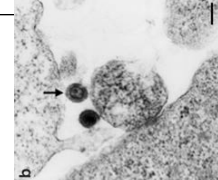


D'après Thorley-Lawson, 2001



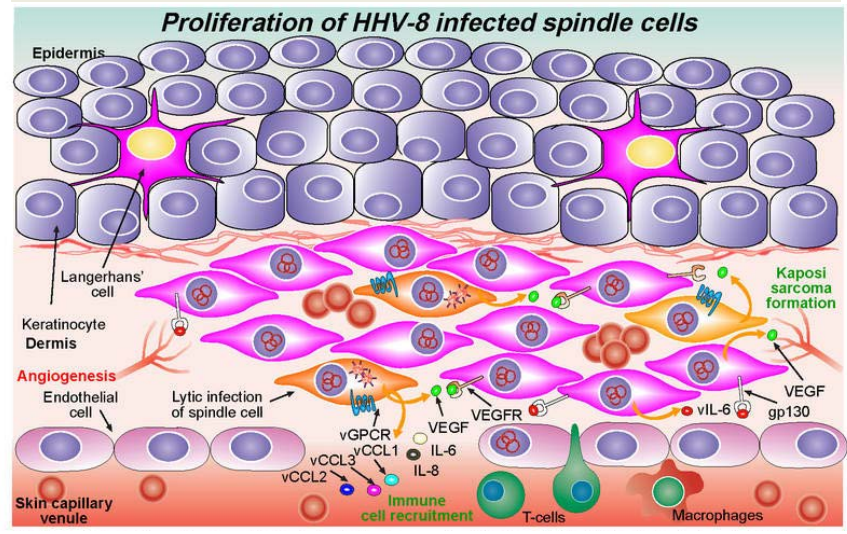
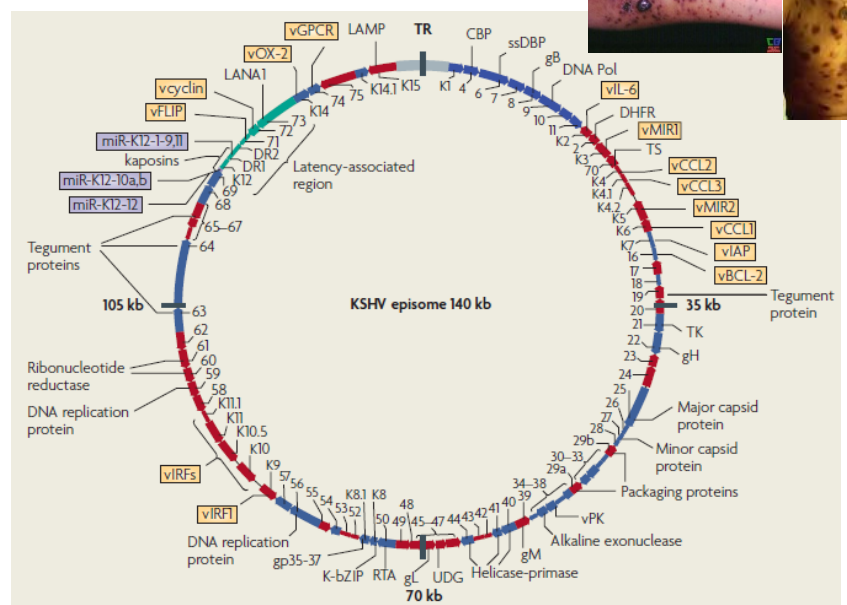
¹Wakisaka and Pagano, *Anticancer Res* 2003 ; ²Wakisaka et al., *Mol Cell Biol* 2004 ; ³Benders et al., *Head and Neck Pathol* 2009

Virus herpès 8 (HHV-8) ou associé au sarcome de Kaposi (KSHV)



Mesri et al. Nat Rev Cancer 2010

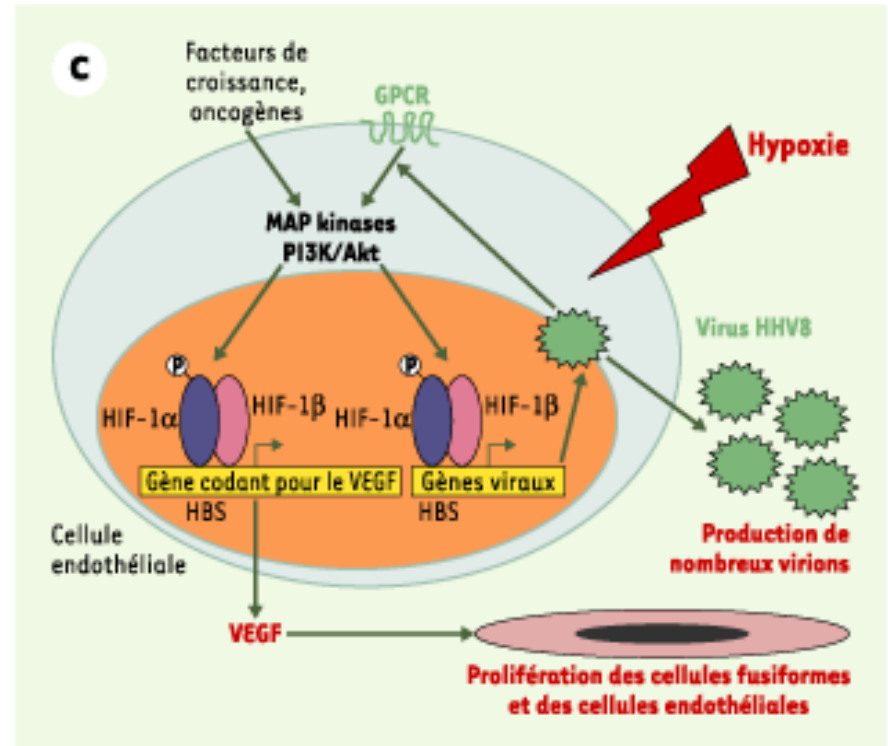
- Herpès virus
 - Cycle lytique (production de particules virales)
 - Latence à vie
 - ADN épisomal non intégré
 - Nombreux gènes de latence (LANA)
 - Certains LANA sont oncogènes
- Nombreux gènes issus de l'hôte
 - Manipulation du système immunitaire
 - Rôle dans la survie et la prolifération cellulaire : vll-6 et vll-8+++ ; synthèse de VEGF^{1,2}
- Virus oncogène
 - Virus latent+++ (LANA)
 - Rôle des particules virales dans la dissémination
- Sarcome de Kaposi (KS) :
 - Néoangiogenèse+inflammation+ prolifération de cellules endothéliales transformées ou *spindle cells*



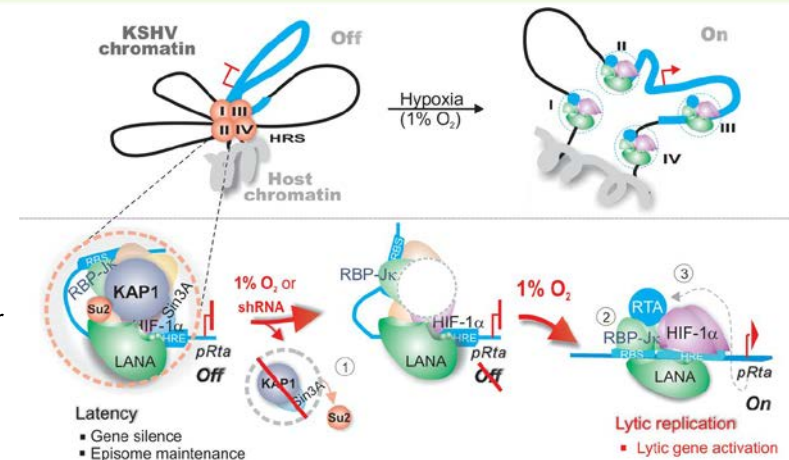
¹Moore et al., Science 1996 ; ²Liu et al., J Virol 2001

Interactions de HHV-8 avec la voie de l'hypoxie

- Cycle lytique : ORF74 code un récepteur couplé à la protéine G (vGPCR)
 - qui active de façon constitutive les kinases MAPK et PI3K/Akt¹
 - **Prolifération cellulaire et cancérogénèse**
 - Sécrétion d'IL-8²
 - Induit la phosphorylation de HIF³
 - **Sécrétion de VEGF**
- Latence (LANA)
 - Activation de la transcription des ARNm HIF⁴
 - Inhibition de la dégradation de HIF^{5, 6}
- Présence de site HBS de fixation pour HIF dans le promoteurs de gènes viraux
 - ↗ cycle lytique^{7, 8, 9}
 - Modification chromatine virale : passage en cycle lytique¹⁰
 - Gènes latents¹¹
- Régulation par la voie hypoxie
 - Homologues cellulaires : vIl-6¹²



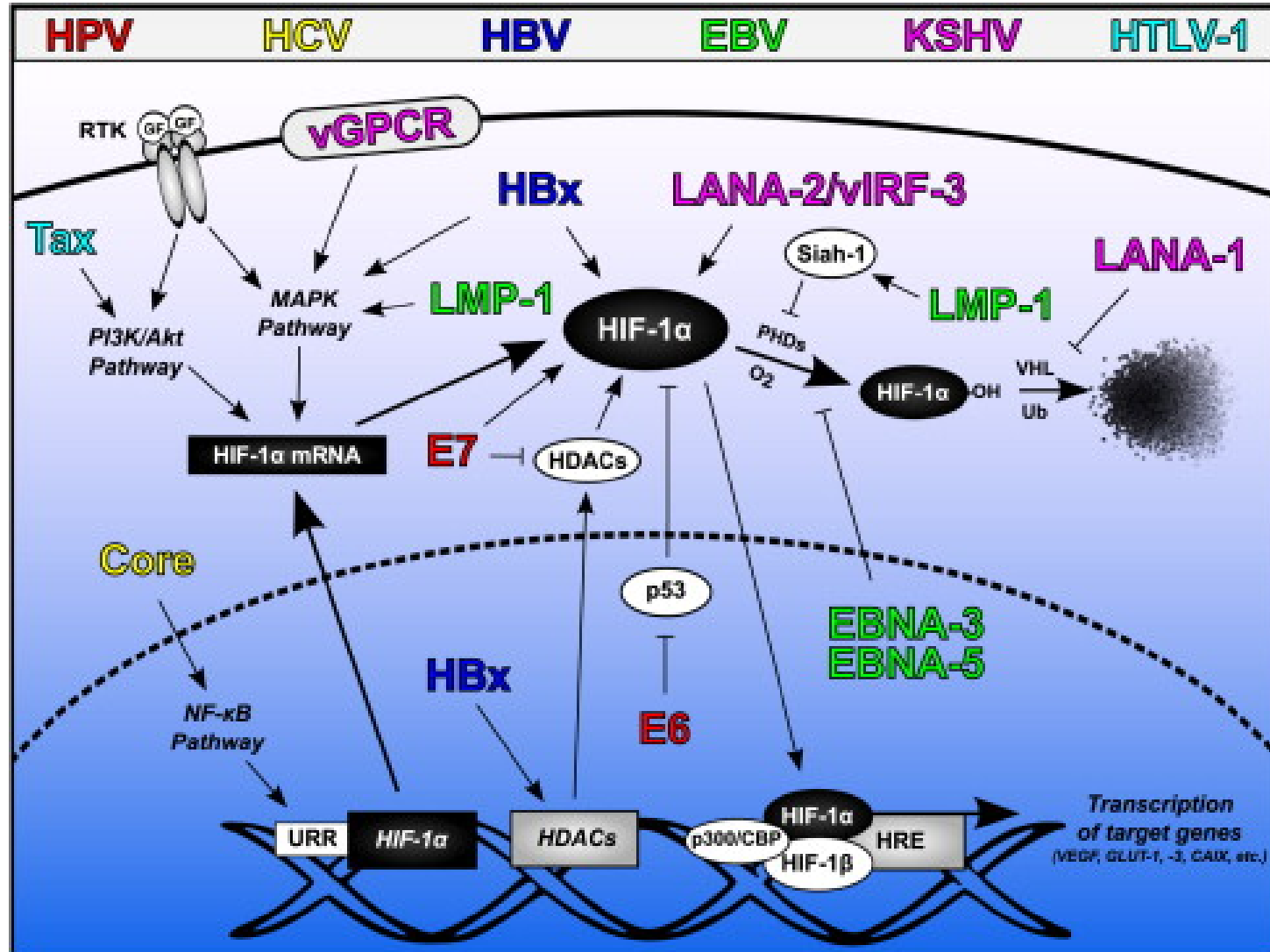
Pillet et Le Guyader, M/S 2005



Zhang L et al. J. Virol. 2014

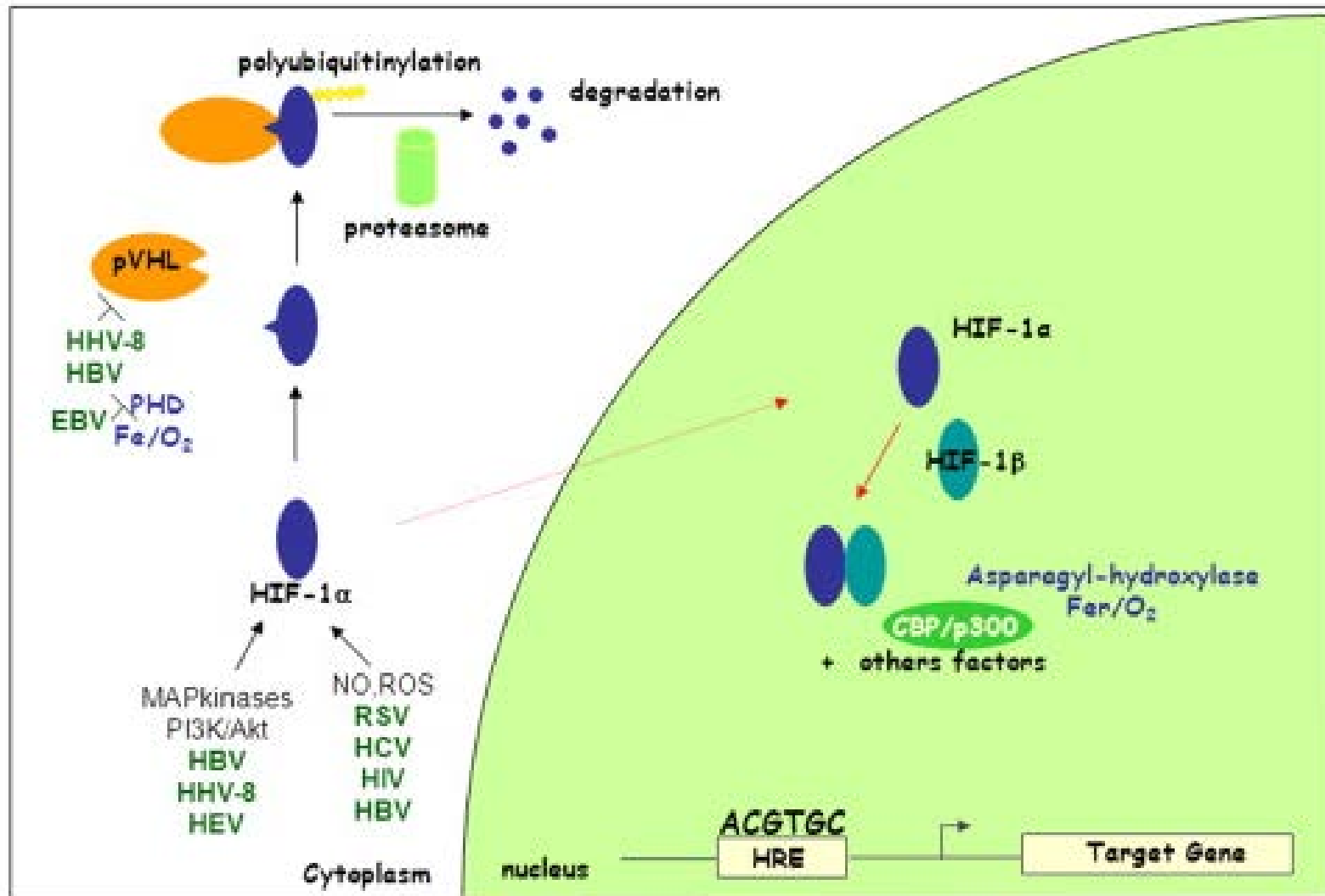
¹Smit et al., *J Virol* 2002; ²Shepard et al., *J Biol Chem* 2001; ³Sodhi et al., *Cancer Res* 2000; ⁴Carroll et al., *J Virol* 2006; ⁵Cai et al., *J Virol* 2007; ⁶Cai et al., *PLoS pathogens* 2013; ⁷Davis et al., *Blood* 2001; ⁸Haque et al., *J Virol* 2003; ⁹Dalton-Griffin et al., *J Virol* 2009; ¹⁰Zhang et al., *J Virol* 2014; ¹¹Veeranna et al., *J Virol* 2012; ¹²Giffin et al., *J Virol* 2014

Interactions des virus oncogènes avec HIF

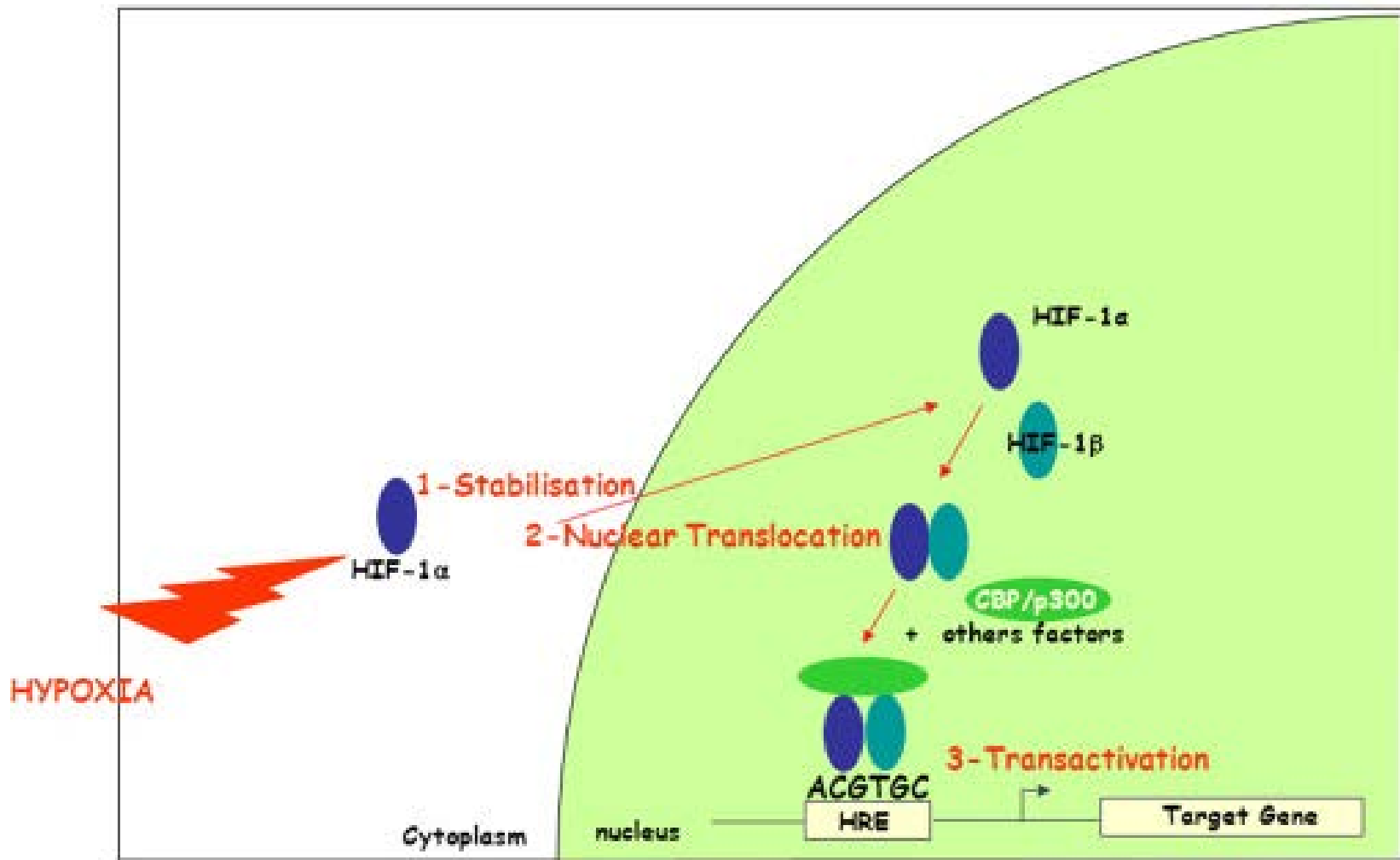


Conclusions et conséquences

En condition de normoxie



En Hypoxie



HHV-8
JCV
HIV-1

Virus « anaérobies » et « aérobies »

- **Virus aéro-anaérobies - expression augmentée par l'hypoxie**

- Parvovirus B19
- Virus de l'hépatite C (HCV)
- HIV
- **Virus Epstein-Barr (EBV)**
- **Virus herpes 8 (HHV-8)**
- **Virus de la stomatite vésiculeuse**^{1,2}
- **Virus de la chorioméningite lymphocytaire**³
- **Virus JC**⁴
- **Virus herpes simplex (HSV)**⁵
- **Reovirus**⁶

Virus oncogènes

Virus à potentiel oncolytique

- **Virus anaérobies**

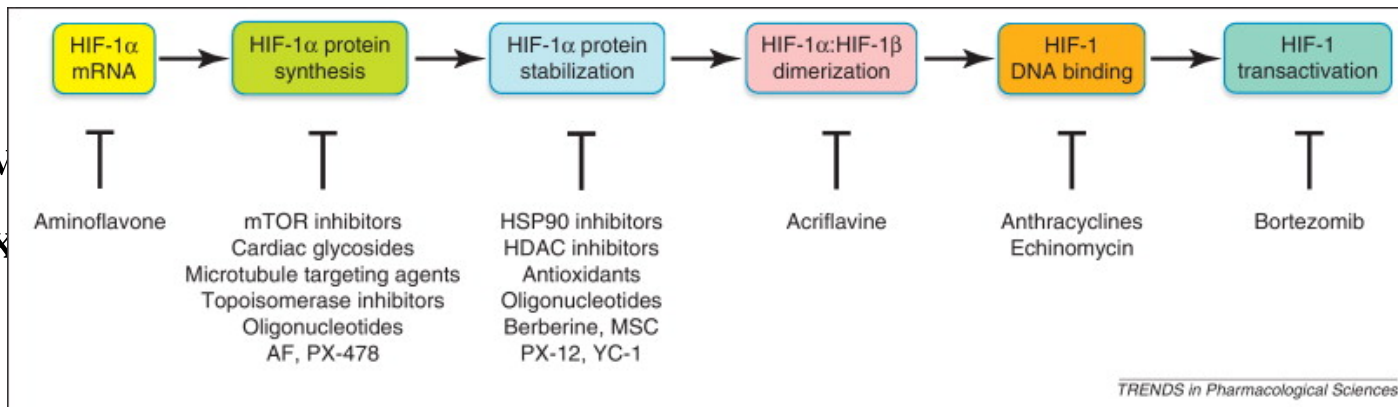
- Bactériophages du tube digestif

- **Virus aérobies**

- Virus grippaux
- Adénovirus?

Conséquences - Nos propositions

- Adaptation des conditions de culture cellulaire
 - Multiplication de virus « non cultivables »
 - Amélioration du diagnostic
 - Anti-virogramme : tenir compte des conditions d'oxygénation pour apprécier l'efficacité des anti-viraux *in vivo*
- Développement de nouvelles stratégies antivirales
 - Molécules ciblant la voie HIF



Semenza, Trends Pharmacol Sci 2012

« disponibilité » à

Un grand merci à:

- UPR 9051-Hôpital Saint-Louis, Paris
- Frédéric Morinet
 - Université Paris VII
 - Pôle Biologie-Pathologie-Physiologie (B2P), GH Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal, Paris
- Claude Capron
 - Université de Saint-Quentin en Yvelines
 - Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie- Hôpital Ambroise Paré, Paris

CHU de Saint-Etienne
EA 3064-GIMAP

- Agents infectieux
 - Thomas Bourlet
 - Bruno Pozzetto



Et pour leur soutien amical : Pr. Henri Agut, Pr. Jean Rommelaere, Dr Marcel Koken