



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller-69373 LYON Cedex 08

Année : 2016

Thèse n°19-2016

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

**Travail effectué dans le Laboratoire de Virologie des Hospices Civils de Lyon et à l'unité
INSERM U1111-CNRS UMR 530 rattachée au centre international de recherche en
Infectiologie (CIRI)
Sous la direction de Pr P. ANDRE**

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERREGIONAL LE 05/10/2016
PAR Mme Caroline CHARRE
NEE LE 20/05/1987 A ANNECY
CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DU DECRET N° 90-810 DU 10 SEPTEMBRE
1990, TIENT LIEU DE THESE

THESE POUR DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**MODULATION DE LA GLYCOLYSE CELLULAIRE
PAR LES VIRUS BK ET INFLUENZA**

JURY

PRESIDENT : Pr J. GOUDABLE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MEMBRES : Pr P. ANDRE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Pr P. GONZALO, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Dr C.SCHOLTES, Maitre de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier
Dr C. RAMIERE, Maitre de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|----------------------|
| • Président de l'Université | M Frédéric FLEURY |
| • Présidence du Conseil Académique | M Hamda BEN HADID |
| • Vice Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| • Vice-Président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLEE |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | M Philippe CHEVALIER |

Composante de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|--|---------------------------------------|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Jérôme ETIENNE |
| • UFR de médecine de Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directeur : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis BOURGEOIS |
| • Institut de Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves MATILLON |
| • Département de formation et de centre de Recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|--|---------------------------------|
| • Faculté de Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE MARCHI |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal FOURNIER |
| • I.U.T LYON 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| • ESPE | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr-PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE – COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Richard COHEN (PU-PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUC

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Monsieur François LOCHER (PU-PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU-HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU-PH)

- **INGENIEURIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU-PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU-HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU-PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**
 - Monsieur Christian BARRES (Pr)
 - Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
 - Madame Kiao Ling LIU (MCU)
 - Monsieur Ming LO (MCU-HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
 - Monsieur Michel TOD (PU-PH)
 - Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
 - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
 - Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
 - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
 - Monsieur Nicolas KUCZEWSKI (MCU)
 - Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
 - Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNEMENTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
 - Monsieur Olicier CATALA (Pr-PAST)
 - Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
 - Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
 - Monsieur Jacques BIENVENU (PU-PH)
 - Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
 - Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU-HDR)
 - Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
 - Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU-PH)
 - Madame Brigitte DURAND (MCU-PH)
 - Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
 - Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
 - Monsieur Jean FRENEY (PU-PH)
 - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
 - Madame Florence MORFIN (PU-PH)
 - Monsieur Didier BLAHA (MCU)
 - Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
 - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
 - Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
 - Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE FONDAMENTALE**
 - Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
 - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
 - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU-PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)
- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
Madame Parie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr-HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)
- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
Madame Florence RANCHON
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Madame Charlotte BOUARD (86^{ème} section)
Madame Laure-Estelle CASSAGNES (85^{ème} section)
Monsieur Karim MILADI (85^{ème} section)
Madame Laurence PAGES (87^{ème} section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maitre de Conférences des Universités

MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Joëlle Goudable,

Vous me faites le très grand honneur de présider ce jury de thèse. En raison de sa thématique alliant virologie et métabolisme, je souhaitais que mon travail soit non seulement jugé par des virologues mais aussi par des biochimistes. Merci d'avoir accepté la proposition. Par ailleurs, je tiens à vous remercier de vos enseignements dispensés à la faculté de Pharmacie de Lyon. Par dessus tout, je tiens à souligner votre disponibilité ainsi que votre complicité avec les élèves, deux éléments qui permettent d'instaurer rapidement des rapports agréables et honnêtes.

A Monsieur le Professeur Patrice André,

Je vous remercie tout d'abord de la confiance que vous m'accordez et de la liberté que vous m'octroyez. Je vous remercie infiniment de la possibilité que vous m'avez offerte de prétendre à un poste d'assistant hospitalo-universitaire qui va me permettre enfin d'enseigner. D'autre part, le travail de recherche que j'ai effectué dans votre équipe INSERM (et qui apparemment va se prolonger) m'a donné goût à la science.

Je me rappelle de la phrase que vous m'avez dite pour me mettre en garde de la lourde charge de travail qui toutefois m'attendait : « j'espère, mademoiselle, que vous n'êtes pas du genre à faire du ski nautique le week-end ». Eh bien je tiens à vous concéder que je n'ai jamais réussi, perchée sur ces grosses planches, à sortir de l'eau. Comme je déteste l'échec, ce ne sera certainement pas ce sport nautique qui me dissuadera de travailler le week-end.

A Monsieur le Professeur Philippe Gonzalo,

C'est avec joie que je vous ai proposé de faire partie de mon jury et vous m'avez fait l'honneur d'accepter. Je vous remercie de vos remarques pertinentes, de cette rigueur, de cette envie de compréhension du détail qui finalement fait beaucoup. Vous avez donné une autre dimension au DES de biochimie en attisant l'intérêt et la curiosité. Je vous remercie de vos cours d'électrochimie dignes de ceux que j'ai reçus en prépa. Enfin, je vous remercie de m'avoir défendu à la suite d'une de mes présentations sur l'ostéodystrophie rénale alors que d'autres me vouaient aux gémonies.

Je me suis même parfois demandé pourquoi ne pas avoir choisi St Etienne pour faire mon internat.

A Madame le Docteur Caroline Scholtès,

Caroline, c'est un grand plaisir pour moi de te voir dans mon jury de thèse. Je te remercie de la formation hospitalière que tu m'as prodiguée. Là où le savoir est difficile à obtenir, tu m'as appris pleins de choses, aussi bien concernant la virologie médicale de routine que la virologie plus fondamentale. Tu m'as permis de rencontrer des cliniciens, d'assister à des staffs et des congrès, qui, j'insiste, ne me plaisent pas uniquement pour la champagne et les paillettes. Je suis ravie de notre relation professionnelle qui me permet de progresser de jour en jour, en alimentant toujours la curiosité et en essayant de comprendre le petit détail. Pour finir, la vivacité de ton esprit est proportionnelle à l'entropie (dans le sens thermodynamique du terme) de ton bureau.

A Monsieur le Docteur Christophe Ramière,

Je suis honorée de ta participation à ce jury et je te remercie, tout comme Caroline de m'avoir formée à la routine hospitalière. Merci aussi de m'avoir encadrée au cours de mon master 2 Recherche et d'avoir été le tout premier à m'initier à la virologie alors que mes connaissances dans le domaine étaient indigentes. Je te remercie pour ta tolérance face à l'ignorance et surtout ta capacité d'admettre que rien n'est évident et que nous n'avons pas la science infuse. J'admire ta conscience professionnelle, ton dévouement et ta passion pour la science. J'allais oublier de te dire aussi merci de m'avoir montré comment me faire de la monnaie avec la machine à café du laboratoire. Enfin si on en croit l'adage « à chaque poil un morceau d'intelligence » (inventé évidemment), le prix Nobel est pour bientôt.

A l'équipe INSERM,

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de recherche au sein de laquelle j'ai pu réaliser mes travaux de master 2 Recherche et qui m'ont permis d'écrire cette thèse.

A Irène,

Merci pour ton aide. Je ne serai jamais une déesse des manip' mais tu m'as permis de limiter les dégâts. Grâce à toi, je n'ai toujours pas fait exploser la tour du CIRI, et cela relève du miracle. Au delà de toutes ces expériences *in vitro*, sache que tu es pour moi une réelle amie, c'est un résultat robuste et reproductible de l'expérience de vie.

A Jean Claude Tardy

Même si j'ai le grand avantage de ne pas être blonde, je préfère enfiler mon gilet pare-balles avant de vous aborder. Toutefois, je tiens à vous témoigner ma grande admiration et saluer vos talents d'orateur. Vous êtes une entité atypique et non convenue qui me donne envie de continuer dans cette voie.

Au personnel des laboratoires des HCL,

Je remercie les techniciens et les OP bio. Toutes ces personnes de qualité avec qui j'ai pu travailler et faire des gardes ; avec qui les liens ont une autre dimension que ceux d'un simple professionnalisme. Je tiens à préciser que leur place dans notre formation d'interne est majeure et je suis d'une reconnaissance sans borne.

A mes parents, Françoise et Jean-Olivier,

Eh bien, merci de m'avoir soutenue durant toutes ces longues années d'études. Cela n'a pas dû être facile, étant soupe au lait à l'état basal, je n'ose même pas imaginer ce que cela a dû être en période d'examens ou de concours. En tout cas j'ai une nouvelle excellente pour vous deux... : ce n'est pas fini! Je vais m'inscrire en thèse de science. J'espère que vous êtes prêts à revoir Tanguy mais cette fois-ci en version féminine.

A Tati Bibi,

Je te remercie pour ta bienveillance et ta disponibilité. Ta générosité est déconcertante et on ne te dit sans doute pas assez merci avec Virginie. Tu as toujours été une deuxième maman. Tu fais parti des repères, des fondamentaux, des choses vers lesquelles on revient systématiquement après avoir fait diverses expériences de vie.

Enfin, à quelques jours de l'impression, je te remercie d'avoir joué au Bernard Pivot un mardi soir à plus de 22h, après avoir vu pléthore de patients.

A Martine,

Tu aides, je ne sais pas comment et je ne veux surtout pas le savoir. C'est bien la première fois que je ne cherche pas à comprendre les choses. Tu es un plus grand mystère que l'infiniment petit ou l'infiniment grand. Comme disait la Piaf, tu me fais tourner la tête, mon manège à moi c'est toi.

A Papy et Mamy,

Un grand merci pour votre soutien et pour votre amour. Merci pour ces longs séjours passés à Annecy le Vieux pour réviser les concours. L'intendance était effectivement gérée d'une main de maître. Si ces moments étaient des caps difficiles, vous les avez adoucis et m'en avez fait garder finalement de très bons souvenirs. Merci pour les petits plats de Papy et pour les longues balades avec Mamy avec qui nous parlions à bâtons rompus passant devant ces vaches qui d'années en années n'ont pas arrêté de brouter (je me demande d'ailleurs encore comment elles ont fait pour ne pas exploser).

A mes cousines germaines, Virginie et Léna,

J'aurais plutôt dû écrire à mes deux sœurs...

A mes oncles,

Merci d'être là dans les moments importants. Mon affection pour vous est très grande.

Aux Jean Mi, Myrtoche, Jean-Max, Segou, Yanner et enfin Picsou, le grand cardio qui se la pète,

Il est très difficile d'exprimer la reconnaissance quand elle est énorme. Votre rencontre est une sacrée aubaine. C'est une amitié que je ne pensais pas tisser si tard. Vous avez été d'un soutien salvateur dans des situations sentimentales à l'eau de rose qui auraient bien pu me mettre à terre. Avant de vous rencontrer je considérais Lyon comme une ville de transit, un lieu obligé dans lequel on étudie et on travaille ; mais une fois les obligations soulevées Lyon était une ville qu'il fallait quitter à tout prix. Maintenant, Lyon c'est la maison et elle est plutôt agréable. Vous êtes mes ninjas préférés et rien que pour vous, je pourrais bien me convertir en pizzaiolo. Enfin mon seul regret est de ne pas vous avoir rencontrés plus tôt.

A Clémence,

Tu es ma meilleure amie et je suis très fière de faire partie de la team MSB. Ta famille est un modèle pour moi. J'aimerais réussir à faire pareil.

A Véandre Lareine,

A l'unique étudiant de pharmacie aussi zinzin que moi. Il y a un lien ténu entre nous, une sorte de fascination et d'étonnement mutuels peu exprimés mais bien réels. Deux choses qui font que le lien certes tenu est indestructible.

A Claire et Alix,

Quand je vous vois j'ai l'impression que c'est les vacances. Je crois qu'il n'y a rien à ajouter.

A mes co-internes,

Je tiens à remercier particulièrement une blonde sulfureuse qui s'est passionnée pour la gestion de la cacathèque du laboratoire de parasito de la X Rousse. Elle m'a fait incarner, le temps d'une virée en bord de mer, le rôle de Thelma (...ou Louise, de toute manière peu importe, notre film était bien mieux tourné et ne mérite même pas cette comparaison).

A Paul

Tu avais raison. Les remerciements sont bien la partie de la thèse la plus difficile à écrire...

« La Corse ? Oh non pas la Corse. Moi je veux aller au Maroc boire du thé à la menthe. » Quelle a été ma déception quand finalement la décision d'un séjour sur l'île de beauté a été prise. Je ne voulais même plus venir. Eh bien je ne sais pas pour quelle raison mais j'ai finalement passé les plus belles vacances de ma vie (ça doit sans doute être le dos de Myrtoche qui m'a fait me croire à Marrakech avec couscous à volonté...).

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	21
2. GENERALITES ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24
2.1. Glycolyse, effet Warburg et infection virale.....	24
2.1.1. Description de l'effet Warburg.....	24
2.1.2. L'effet Warburg : une stratégie de multiplication virale universelle ?.....	26
2.1.3. L'hexokinase (HK) : un élément de recherche d'intérêt.....	27
2.2. Objectifs de l'étude et démarche d'évaluation de la glycolyse.....	30
2.3. Modèles viraux étudiés.....	32
2.3.1. Le virus BK.....	32
2.3.1.1. Caractérisation de l'agent infectieux.....	32
2.3.1.1.1. Taxonomie et généralités.....	32
2.3.1.1.2. Structure et organisation génomique.....	35
2.3.1.1.3. Cycle de réplication.....	37
2.3.1.1.4. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques.....	41
2.3.1.2. Justification du choix du modèle viral.....	43
2.3.2. Le virus influenza de type A.....	45
2.3.2.1. Caractérisation de l'agent infectieux.....	45
2.3.2.1.1. Taxonomie et généralités.....	45
2.3.2.1.2. Structure et organisation génomique.....	46
2.3.2.1.3. Cycle de réplication.....	48
2.3.2.1.4. Pourvoir pathogène et manifestation clinique.....	51
2.3.2.2. Justification du choix du modèle viral.....	52
3. MATERIELS ET METHODES.....	54
3.1. Cultures cellulaires.....	54

3.2. Productions des stocks viraux et titrations.....	54
3.3. Infections virales et récoltes des échantillons.....	55
3.4. Immunofluorescence indirecte comme témoin d'infection.....	56
3.5. Dosage biochimique du glucose et du lactate.....	59
3.6. Design des amorces.....	59
3.7. PCR quantitative après transcription inverse (RTq-PCR).....	62
3.8. Dosage de l'activité HK.....	62
3.9. Analyses statistiques.....	63
4. RESULTATS.....	64
4.1. Influence de l'infection par le virus BK sur la glycolyse.....	64
4.1.1. L'infection par le virus BK active la glycolyse aérobie.....	64
4.1.2. L'effet de l'infection du virus BK sur la glycolyse ne résulte pas de la modulation de l'expression des gènes étudiés impliqués dans la glycolyse....	67
4.1.3. L'infection par le virus BK augmente l'activité apparente de l'HK.....	71
4.2. Influence de l'infection par le virus influenza de type A sur la glycolyse.....	72
4.2.1. L'infection par le virus influenza de type A n'active pas la glycolyse.....	72
4.2.2. L'infection par le virus influenza de type A engendre d'importantes modifications transcriptionnelles des gènes impliqués dans la glycolyse.....	74
4.2.3. L'infection par le virus influenza de type A n'augmente pas l'activité de l'HK.....	76
5. DISCUSSION.....	77
6. CONCLUSIONS.....	84
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Description générale du métabolisme cellulaire et de sa modification potentielle par les différentes infections virales.....	22
Figure 2. Représentation schématique de la phosphorylation oxydative, de la glycolyse anaérobie et de la glycolyse aérobie observée lors de l'effet Warburg.....	25
Figure 3. Représentation des différentes isoformes de l'hexokinase.....	28
Figure 4. Schéma de la glycolyse aérobie.....	31
Figure 5. Structure générale du génome des polyomavirus.....	36
Figure 6. Orchestration de la réplication virale par l'antigène grand T.....	38
Figure 7. Cycle répliatif des polyomavirus.....	40
Figure 8. Génome du virus de la grippe et protéines associées.....	47
Figure 9. Cycle répliatif du virus de la grippe.....	50
Figure 10. Schéma des étapes expérimentales menées pour l'étude du virus BK avant les analyses métaboliques.....	57
Figure 11. Schéma des étapes expérimentales menées pour l'étude du virus influenza de type A avant les analyses métaboliques.....	58
Figure 12. Immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur les cellules RPTE à J3 post infection par le virus BK.....	65
Figure 13. Effet de l'infection des cellules RPTE par le virus BK sur la consommation de glucose et la production de lactate à J2, J3 et J5 post infection.....	66

Figure 14A. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J3 post infection.....	67
Figure 14B. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J3 post infection.....	68
Figure 15A. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J5 post infection.	69
Figure 15B. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J5 post infection.	70
Figure 16. Modulation de l'activité de l'HK dans les cellules RPTE infectée par le virus BK à J5 post infection.....	71
Figure 17. Immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur les cellules A549 à 20H post infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34.....	72
Figure 18. Effet de l'infection des cellules A549 par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 sur la consommation de glucose et la production de lactate à 20H post infection.....	73
Figure 19A. Effet de l'infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules A549, à 20H post infection.....	74
Figure 19B. Effet de l'infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules A549, à 20H post infection.....	75
Figure 20. Modulation de l'activité de l'HK dans les cellules A549 à 20H post infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34.....	76
Figure 21. Représentation des rôles multiples de l'isoforme 2 de l'hexokinase.....	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taxonomie des polyomavirus humains et leur contribution en pathologie humaine.....34

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour évaluer l'expression des différents gènes étudiés.....61

LISTE DES ABREVIATIONS

ACoA	Acétyl-CoA
Ad5	Adénovirus de type 5
Agno	Agnoprotéine
AgT	Antigène grand T
Agt	Antigène petit T
AgT'	Antigène grand T dérivant d'un épissage alternatif
ALDO	ALDOlase
ARNc	Acide RiboNucléique complémentaire
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNv	Acide RiboNucléique viral
ATCC	American Type Culture Collection. Société américaine. Grand centre de ressources biologiques
ATP	Adenosine TriPhosphate
A549	Cellules alvéolaires carcinomateuses humaines utilisées dans l'étude
α-KG	α -KétoGlutarate, α -cétoglutarate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CD4	Cluster de Différenciation 4
CH	Cystite Hémorragique
CMV	CytoMégaloVirus
CO₂	Dioxyde de Carbone
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DENV	DENgue Virus, Virus de la Dengue
DMEM	Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium Milieu minimum essentiel de Dulbecco
EBV	Epstein Barr Virus, Virus Epstein Barr
ENO	Enolase
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
GCK	GluCoKinase
GLUT	GLUcose Transporter, Transporteur de glucose
G-6-P	Glucose-6-Phosphate
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase
GPI	Glucose-6-Phosphate Isomérase

HCl	Acide chlorhydrique
HHV-8	Human HerpesVirus-8, Herpèsvirus Humain de type 8
HIF1α	Hypoxia Inductible Factor 1 α
HK	HexoKinase
HPV	Human PapillomaVirus, Papillomavirus Humain
HPyV6	Human PolYomaVirus 6, Polyomavirus humain de type 6
HPyV7	Human PolYomaVirus 7, Polyomavirus humain de type 7
HPyV9	Human PolYomaVirus 9, Polyomavirus humain de type 9
HSV	Herpes Simplex Virus, Virus de l'Herpès
HxNy	Hemagglutinine x Neuraminidase y : sous-type du virus Influenza de type A. (x = [1,16] ; y = [1, 9])
IAV	Influenza A Virus, Virus Influenza de type A
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IL	Interleukine
J	Jour
KIPyV	Karolinska Institute PolYomavirus
LDHA	Lactate DesHydrogénase de type A
LDHB	Lactate DesHydrogénase de type B
MAYV	MAYaro Virus, Virus Mayaro
MCPyV	Merkel Cells PolYomaVirus, Polymavirus de Merkel
MDCK	Madin Darby Canine Kidney, Cellules canines épithéliales de rein
MF1	Maturation Factor 1, Facteur de maturation 1
MGB	Minor Groove Binder
MIQE	Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments, Informations minimum requises pour la publication d'expériences menées en PCR quantitative en temps réel
MWPyV	Malawi PolYomaVirus
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit, H pour Hydrogène
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Centre américain pour les informations biotechnologiques
NH3	Ammoniac
NS	Non Structural

OAZ1	Ornithine decarboxylase AntiZyme 1, Anti-enzyme de l'ornithine décarboxylase
OxPhos	Phosphorylation Oxydative
PA	Polymerase Acidic protein, Protéine acide du complexe de la polymérase
PB1	Polymerase Basic protein 1, Protéine basique 1 du complexe de la polymérase
PB2	Polymerase Basic protein 2, Protéine basique 2 du complexe de la polymérase
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen Antigène nucléaire de prolifération cellulaire,
PFK	PhosphoFructoKinase
PGK	PhosphoGlycérate Kinase
Pi	Phosphore inorganique
PKM	Pyruvate Kinase de type M (M comme Musculaire)
PKLR	Pyruvate Kinase de type L/R (Liver/RBC, foie/réticulocytes)
Pol δ	Polymérase δ
PolioV	PolioVirus, Virus de la Polio
PR8	Souche A/H1N1/ <u>Puerto Rico</u> /8/34
PVAN	Polyomavirus Associated Nephropathy, Néphropathie associée aux polyomavirus
Px	Plaque x puits
REGM	Renal Epithelial Cell Growth Medium, Milieu pour cellules épithéliales de rein
RFC	Replication Factor C, Facteur de réplication C
RNP	RiboNucleotProtéine, Complexe ribonucléoprotéique
RPA	Replication Protein A, Protéine de réplication A
RPTEC	Renal Proximal Tubular Epithelial Cells, Cellules épithéliales de tubule proximal de reins
RSV	Rous Sarcoma Virus, Virus du sarcome de Rous
RTq-PCR	Reverse Transcription quantitative-Polymerase Chain Reaction, PCR quantitative après transcription inverse
SLC2A	SoLute Carrier famille 2 sous-famille A
STLPyV	St Louis POLYomaVirus
SVF	Sérum de Veau Fœtal

SV40	Simien Virus 40, Virus Simien 40
TBP	TATA-box Binding Protein, Protéine liant la TATA-box
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
Topo I	Topoisomérase I
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha, Facteur de nécrose tumorale alpha
TPCK	Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone
TSPyV	Trichodysplasie Spinulosa-associated Polyomavirus
T75	Flasque de 75 cm ² de surface
VACV	VACCinia Virus, Virus de la vaccine
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP	Viral Protein, Protéine virale (exemple : VP1-4, Protéines virales de type 1 à 4)
VZV	Varicella-Zoster Virus, Virus Varicelle-Zona
WUPyV	Washington University PalYomaVirus

1. INTRODUCTION

Le virus est un parasite intracellulaire obligatoire qui dépend de son hôte pour l'apport à la fois des ressources énergétiques et des constituants organiques élémentaires, à savoir lipides, nucléotides et acides aminés. Une des stratégies du virus pour générer ces éléments nécessaires à la réplication et à la synthèse de nouvelles particules virales est le détournement du métabolisme de la cellule infectée. Malgré d'importantes différences entre les virus, tous ont développé des stratégies réplicatives ciblant les réseaux métaboliques de la cellule infectée. A ce titre, il a été montré que pour prolonger la survie de la cellule infectée et assurer la réplication du génome et la production de virions, une grande partie des virus usurpe des ressources métaboliques cellulaires en stimulant notamment l'absorption des nutriments et le catabolisme des cellules infectées. L'étude des ces modulations métaboliques constitue un nouveau champ d'investigation et ouvre de nouvelles possibilités de stratégies thérapeutiques. Une vision globale du métabolisme cellulaire ainsi que les principales voies métaboliques modifiées par les infections virales sont représentées Figure 1. Sur ce schéma apparaît de manière claire que le glucose est un élément nutritif majeur du métabolisme cellulaire. Il est non seulement le substrat initial pouvant aboutir à la synthèse de diverses biomolécules élémentaires constituant la biomasse mais aussi une source énergétique capitale. En effet, après son entrée dans la cellule, le glucose est métabolisé en glucose-6-phosphate (G-6-P), intermédiaire central, pouvant s'engager dans la voie des pentoses phosphates pour assurer la synthèse de nucléotides ou dans la glycolyse pour aboutir au pyruvate. Le pyruvate peut alors être réduit en lactate sécrété par la cellule ou décarboxylé en acétyl-CoA (ACoA) qui peut s'engager à son tour dans le cycle de Krebs pour aboutir à la phosphorylation oxydative, voie majeure d'apport énergétique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Le citrate intermédiaire du cycle de Krebs peut le quitter pour participer à la synthèse des acides gras au sein de la mitochondrie.

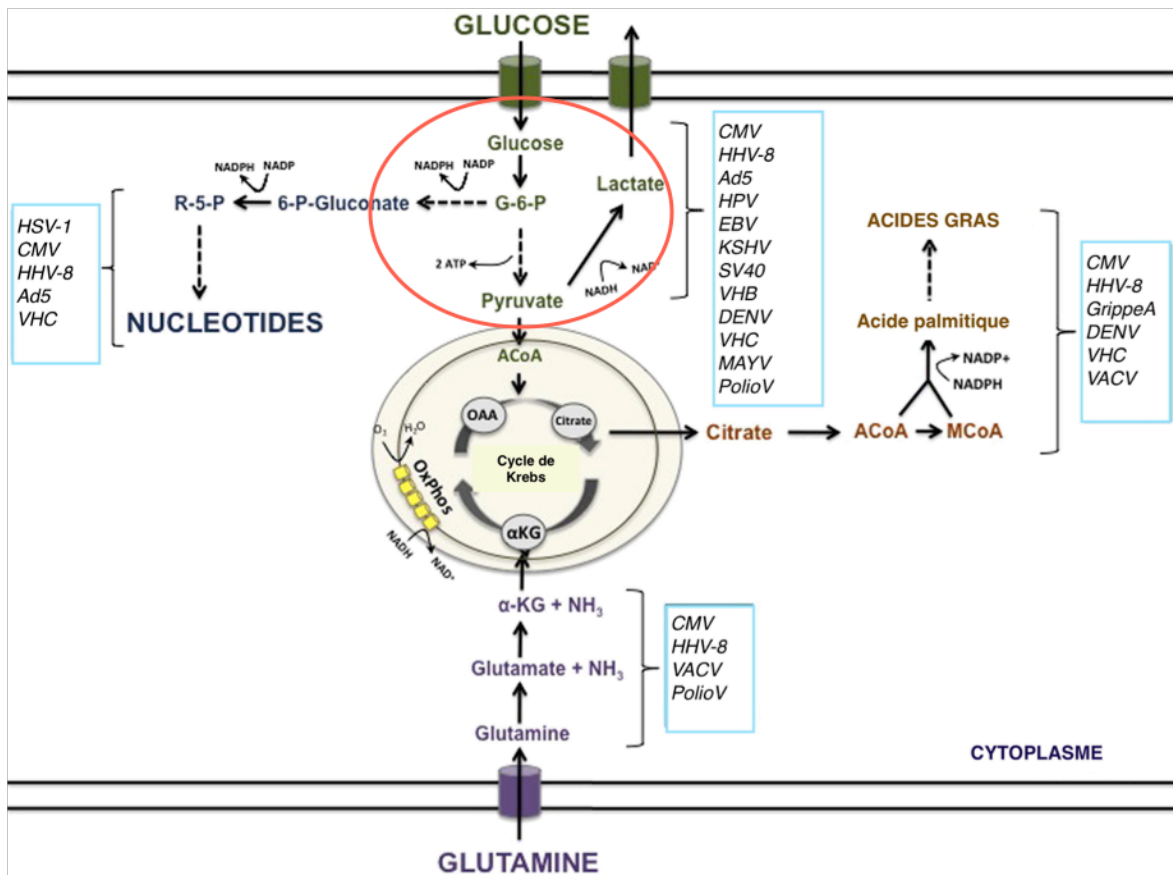


Figure 1. Description générale du métabolisme cellulaire et de sa modification potentielle par les différentes infections virales. Sont mises en évidence sur cette figure les voies métaboliques majeures connues pour être modulées par les virus : la glycolyse en vert, la synthèse des acides gras en marron, la glutaminolyse en violet, la voie des pentoses phosphates en bleu foncé. Pour chaque voie sont mis en regard les différents virus connus pour la modifier. CMV, cytomégalovirus ; HHV-8, herpès virus humain de type 8 ; Ad5, adénovirus de type 5 ; HPV, papillomavirus humain ; EBV, virus Epstein Barr ; SV40, virus simien 40 ; VHB, virus de l'hépatite B ; VHC, virus de l'hépatite C ; DENV, virus de la dengue ; MAYV, virus Mayaro ; VACV, virus de la vaccine ; PolioV, virus de la polio ; G-6-P, glucose-6-phosphate ; ACoA, acétyl-CoA ; α -KG, α -ketoglutarate ; NH_3 , ammoniac, OxPhos, phosphorylation oxydative (adapté de (1)).

Notamment en raison de son rôle central dans le métabolisme, nous nous sommes principalement concentrés sur la modulation de la voie de la glycolyse par les infections virales. Plusieurs études ont porté sur cette thématique et ont montré qu'une grande partie des virus avaient tendance à augmenter cette voie métabolique (1,2,3). De manière intéressante, dans la majorité des cas étudiés, cette augmentation est similaire à celle observée dans les cellules cancéreuses et décrite sous le nom d'effet Warburg.

Nous décrivons dans un premier temps ce phénomène et poseront la problématique de son universalité en tant que stratégie répliquative et celle de ses mécanismes intrinsèques. Autrement dit, les effets de l'infection virale sur le métabolisme glycolytique et leurs causes sont-ils fonction de la famille virale et donc du type de cycle répliquatif et d'infection ?

Pour réduire ce champ d'investigation très vaste, deux virus très différents et peu étudiés d'un point de vue métabolique ont fait l'objet de notre étude : le virus BK, virus à ADN non enveloppé, responsable d'infections latentes et chroniques pouvant se réactiver dans certaines conditions d'immunodépression ainsi que le virus influenza de type A, virus à ARN enveloppé responsable d'infection aiguë et résolutive dans la majorité des cas.

A la suite d'infections menées *in vitro*, la glycolyse a été évaluée. Après avoir abordé les différents niveaux d'appréciation de la glycolyse et certains points de régulations potentiels que nous avons choisis d'étudier, nous décrivons les deux modèles viraux de manière précise, en mettant en avant l'intérêt particulier de l'analyse des modifications métaboliques qu'ils peuvent engendrer dans les cellules infectées.

Nous décrivons par la suite, la méthodologie de notre étude, puis les résultats obtenus que finalement nous discuterons.

2. GENERALITES ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

2.1. Glycolyse, effet Warburg et infection virale

2.1.1. Description de l'effet Warburg

Les études de plusieurs modèles viraux ont montré que la voie de la glycolyse était particulièrement modulée par l'infection virale (Figure 1). En apport d'oxygène normal et dans une cellule différenciée saine une molécule de glucose est convertie en pyruvate dans le cytoplasme puis en dioxyde de carbone (CO₂) dans le compartiment mitochondrial lors du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Cette voie métabolique aboutit à la formation de 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP). De manière complémentaire en absence d'oxygène, la glycolyse anaérobie est privilégiée. Cette voie métabolique aboutit à la formation de lactate, forme réduite du pyruvate, et à seulement 2 molécules d'ATP. Le rendement énergétique par molécule de glucose est alors divisé par 18 (4). De manière intéressante, dans la majorité des cas étudiés, les modifications du métabolisme glycolytique observées dans les cellules infectées seraient très proches de celles observées dans les cellules cancéreuses ou en division. En effet, de manière similaire à la réplication virale et à la formation de virions, la prolifération cellulaire nécessite des ressources énergétiques et organiques afin de reproduire les composants de la cellule (membranes, protéines, acides nucléiques). Une des stratégies utilisées par la cellule en prolifération est la dégradation préférentielle du glucose en lactate et ce, quelles que soient les conditions en oxygène et l'intégrité mitochondriale. Plus précisément, environ 85% des molécules de glucose sont métabolisées en lactate, le reste passe par la phosphorylation oxydative maintenue à bas bruit. Le rendement énergétique est alors de 4 ATP par molécule de glucose. Ainsi pour maintenir une production d'énergie suffisante la cellule augmente le flux glycolytique. Environ 10% de ce flux est dévié dans les voies de biosynthèse en amont de la production de pyruvate, ce qui aboutit à une augmentation d'intermédiaires métaboliques pouvant s'engager dans des voies anaboliques dérivant de la glycolyse principale et ainsi participer à la formation de biomasse, autrement dit de constituants organiques élémentaires, à savoir nucléosides, acides aminés, sucres et acides gras (Figure 2). D'autre part, à côté de cet apport de biomasse, ce phénomène permet de fournir plus rapidement de l'ATP (1).

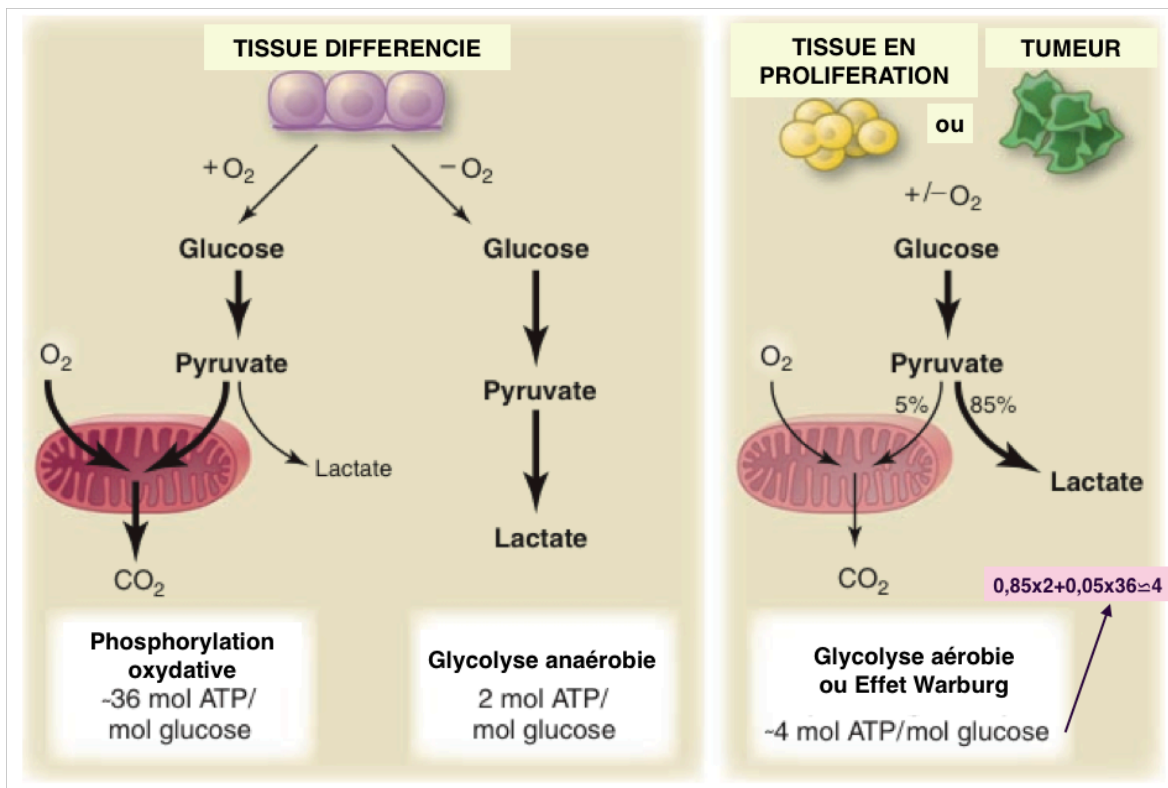


Figure 2. Représentation schématique de la phosphorylation oxydative, de la glycolyse anaérobie et de la glycolyse aérobie observée lors de l'effet Warburg. En présence d'oxygène, les cellules différenciées métabolisent via la glycolyse le glucose en pyruvate oxydé par la suite en CO₂ lors de la phosphorylation oxydative. Pendant cette ultime étape, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons, il est donc nécessaire à l'oxydation complète du glucose. Lorsque l'oxygène fait défaut, les cellules dévient le pyruvate de la mitochondrie en le convertissant en lactate. Toutefois le rendement énergétique est alors divisé par 18. Warburg a observé que les cellules cancéreuses ont tendance à convertir préférentiellement le glucose en lactate quelque soit les conditions en oxygène. (d'après (4)).

Ce phénomène est communément appelé l'effet Warburg, nom de celui l'ayant observé pour la première fois (4). Par analogie avec les cellules cancéreuses, l'activation de la glycolyse aérobie semble être une stratégie répllicative pour de nombreux modèles viraux très divers sur le plan structural. L'effet Warburg ne serait donc pas une observation métabolique restreinte au domaine de l'oncologie.

2.1.2. L'effet Warburg : une stratégie de multiplication virale universelle ?

Grace à l'effet Warburg, le virus redirigerait le métabolisme de la cellule hôte de telle sorte que la disponibilité de composants élémentaires pour la production des virions reste compatible avec une production d'énergie suffisante et bien sûr avec la survie plus ou moins temporaire de la cellule infectée. Cette modulation de la glycolyse est observée à la fois pour des virus à ADN : le cytomégalovirus (CMV) (5,6), l'herpès virus humain de type 8 (HHV-8) (7), l'adénovirus (Ad5) (8,9), le papillomavirus humain (HPV), le virus Epstein Barr (EBV) (10), le virus simien 40 (SV40) (11), le virus de l'hépatite B (VHB) (12); mais aussi pour des virus à ARN : le virus de la dengue (DENV) (13), le virus de l'hépatite C (VHC) (14,15), le virus de la polio (PolioV) (16) et le virus Mayaro (MAYV) (17). De manière inattendue, même les infections latentes peuvent induire la glycolyse. En effet, certains *herpesvirus* à savoir l'EBV (10) et l'HHV-8 (18,19), sont capables d'engendrer, même en phase de latence, l'induction du métabolisme glycolytique. Or, en phase de latence il y a peu ou pas de production de virions et l'expression des gènes viraux est limitée, ainsi la nécessité de changements métaboliques rapides est donc moins évidente à comprendre. En revanche, la survie de la cellule infectée de manière latente est nécessaire à la prospérité de l'infection. Par conséquent, on peut penser que l'induction de la glycolyse est non seulement nécessaire à la répllication des acides nucléiques et à la production de virions mais aussi qu'elle joue un rôle dans la survie des cellules infectées.

Le nombre de virus modulant la glycolyse, leur diversité d'un point de vue évolutif et structural ainsi que le type d'infection, confortent l'hypothèse selon laquelle cette modulation est une stratégie répllicative quasi incontournable. Néanmoins les mécanismes concourant à ces modifications métaboliques sont mal connus et constituent un nouveau champ d'investigation. Pour comprendre ces mécanismes, plusieurs techniques d'analyses métaboliques ont été mises à profit. Des approches de transcriptomique, protéomique (15,20), métabolomique (12), ou encore, de fluxomique (5) ont permis d'apprécier les

effets de l'infection sur le métabolisme ainsi que les mécanismes impliqués en évaluant les différents niveaux de régulation virale potentiels.

Ainsi certaines cibles cellulaires de modulation précises ont été mises en évidence, notamment, la première enzyme limitante de la glycolyse, l'hexokinase (HK).

2.1.3. L'hexokinase : un élément de recherche d'intérêt

Dépendamment de l'ATP, l'HK assure la phosphorylation du glucose en G-6-P lors de la première étape obligatoire de la glycolyse. Cette enzyme permet de maintenir en aval un gradient de concentration qui facilite l'entrée de glucose dans la cellule. Par ailleurs, cette réaction constitue une véritable plaque tournante du métabolisme dans la mesure où elle est la première étape de toutes les principales voies d'utilisation du glucose, notamment, la glycolyse *stricto sensu* mais aussi la voie des pentoses phosphates et la glycogénèse. Ainsi l'HK est particulièrement bien placée pour influencer la vitesse du flux glycolytique et sa direction dans telle ou telle voie métabolique cellulaire.

Il y existe 4 isoenzymes de l'HK (HK1-4) dont la distribution tissulaire, la localisation au sein de la cellule, le modèle d'expression, l'activité ainsi que la régulation diffèrent. Chaque isoenzyme est codée par des gènes différents.

HK4 aussi connue sous le nom de glucokinase (GCK) diffère particulièrement des autres isoenzymes par le fait que son affinité pour le glucose est très faible la rendant peu active dans des conditions physiologiques et qu'elle n'est pas inhibée par le G-6-P (21). Par ailleurs son poids moléculaire est deux fois plus faible que celui des autres isoenzymes. Cette caractéristique résulte de la duplication et de la fusion d'un domaine unique de l'HK au cours de l'évolution (22). HK4 ne présente pas cette duplication. Contrairement à HK4 ; HK1, 2 et 3 ont toutes une forte affinité pour le glucose. Par ailleurs, ces 3 isoenzymes sont inhibées par leur produit, le G-6-P. Néanmoins le phosphore inorganique Pi antagonise ce phénomène pour l'HK1 alors qu'il l'amplifie pour HK2 et HK3. Or, les concentrations intracellulaires relatives du G-6-P et du Pi sont étroitement associées à l'état énergétique de la cellule. Aussi, HK1 serait plutôt impliquée dans des processus cataboliques conduisant à la production d'énergie, alors que HK2 et HK3 seraient davantage impliquées dans des processus anaboliques, fournissant par exemple du G-6-P pour la voie des pentoses ou la synthèse de glycogène (22). D'autre part, contrairement à HK3, HK1 et HK2 possèdent une extrémité hydrophobique N terminale et peuvent donc se lier à l'extrémité externe du pore mitochondrial VDAC (acronyme venant de l'anglais

« voltage dependent anion channel »). Elles sont alors directement en contact avec l'ATP, le co-substrat donneur d'un groupement phosphate et résultant de la phosphorylation oxydative; par ailleurs la liaison de HK2 à VDAC inhibe le rétrocontrôle négatif normalement exercé par le G-6-P produit par l'enzyme (22,23). Les caractéristiques des différentes isoenzymes de HK sont représentées Figure 3.

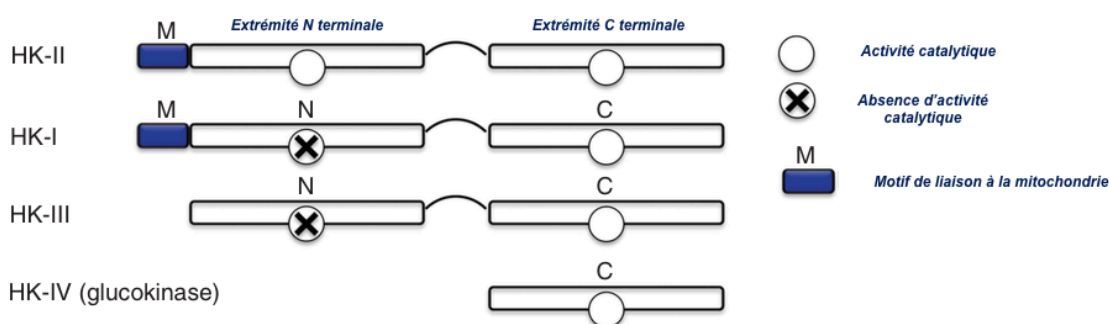


Figure 3. Représentation des différentes isoformes de l'hexokinase (d'après (24)).

HK2 est une isoenzyme particulièrement intéressante dans la mesure où elle est surexprimée dans les cellules tumorales. En effet, au delà de son simple rôle de phosphorylation du glucose, cette enzyme joue un rôle important dans l'effet Warburg observé dans les cellules tumorales. Ainsi sa localisation mitochondriale contribuerait de manière importante à l'augmentation du flux glycolytique observé lors des processus prolifératifs. Mais pourquoi HK2 plutôt que HK1 ? Une des explications est que l'isoenzyme HK2 est multifonctionnelle et a deux avantages supplémentaires jouant un rôle dans la survie cellulaire : un effet protecteur mitochondrial (25,26), ainsi qu'une capacité à stimuler l'autophagie dans des conditions de déplétion en glucose (27).

En virologie, notre équipe a montré l'existence d'une interaction entre la protéine non structurale NS5A du VHC et HK2 avec pour conséquence des répercussions fonctionnelles telles que l'augmentation des paramètres catalytiques de l'enzyme (14). D'autre part, il a aussi été montré mais non publié une interaction entre l'HK et la protéine non structurale NS3 du DENV.

Néanmoins, une question essentielle reste celle de l'universalité de l'activation de la glycolyse aérobie en tant que stratégie de multiplication. Autrement dit, ce phénomène est-il vraiment engendré par toute infection virale? L'étude de certains virus tend à infirmer cette hypothèse très généraliste. En effet, pour certains virus, les observations sont contradictoires. Une étude de métabolomique menée par Vastag *et al.* sur des cellules primaires de fibroblastes humains, a montré que le virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) n'augmente pas la glycolyse (6). Cependant, en utilisant une autre souche de virus et des cellules Vero, une autre équipe a montré que l'HSV-1 induit la consommation de glucose et la production de lactate par induction de la phosphofructokinase (PFK), deuxième enzyme limitante de la glycolyse (28). Par ailleurs, le VIH de type 1 activerait la glycolyse uniquement dans les lymphocytes T CD4+ mais pas dans les macrophages (29). Les macrophages maintiennent généralement une infection à long terme tandis que les lymphocytes T CD4+ sont le plus souvent soumis à une infection lytique plus aiguë, ce qui peut expliquer ces différences. Ainsi, en considérant les études menées sur HSV-1 et le VIH, l'activation des voies métaboliques spécifiques dépendrait du type de cellules infectées. Ceci souligne l'importance du type cellulaire testé pour les études métaboliques. En outre, le virus de la vaccine (VACV), famille des *Poxviridae*, n'augmenterait non seulement pas la glycolyse mais n'aurait pas besoin d'apport en glucose (30), la source de carbone nécessaire à la réplication proviendrait essentiellement de la glutamine. Enfin, bien que sa réplication dépende de la glycolyse, en témoigne la baisse de sa réplication engendrée par l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse (31), des données contradictoires ne permettent pas de conclure quant à l'effet de l'infection du virus influenza de type A sur le métabolisme glycolytique. Aussi, considérant les quatre modèles viraux suscités, l'induction de la glycolyse par l'infection virale n'est pas systématique. D'autre part, la modulation de cette voie métabolique semble différer d'un virus à l'autre tant au niveau de l'effet que de la mécanistique.

2.2. Objectif de l'étude et démarche d'évaluation de la glycolyse

L'objectif de notre étude a été d'explorer, au niveau transcriptionnel et protéique, le retentissement de l'infection virale sur le métabolisme cellulaire glycolytique de manière à détecter des cibles cellulaires, qui d'un point de vue applicatif peuvent constituer des cibles potentielles pour de nouvelles thérapeutiques originales. En effet, en contrôlant l'emballage de la glycolyse par des molécules inhibitrices, il devrait être possible de contrôler l'infection virale mais aussi la prolifération cellulaire observée dans les cancers. L'intérêt de ce champ d'investigation est de taille dans la mesure où il offre des perspectives de traitements à large spectre tant pour les maladies infectieuses virales que pour les traitements anticancéreux. Par surcroît, de manière inverse, la synthèse de peptides mimant l'effet du virus sur la glycolyse en l'activant constitue une idée intéressante de traitement pour les maladies associées à des troubles métaboliques notamment le diabète non insulino-dépendant.

Aussi, pour apprécier l'effet global de l'infection sur la glycolyse, ont été quantifiées la consommation de glucose et la production de lactate par les cellules.

Pour apprécier la régulation au niveau transcriptionnel et détecter d'éventuelles cibles, nous avons choisi de quantifier l'expression des gènes codant pour la majorité des enzymes de la glycolyse ainsi que pour les 4 isoformes des transporteurs membranaires passifs du glucose (GLUT1 à 4, dont les gènes sont aussi connus sous l'acronyme SCL2A1 à 4 pour l'anglais « solute carrier family »). Par ailleurs, la voie des pentoses étant majeure pour la synthèse des nucléotides, éléments primordiaux pour la réplication virale, nous avons évalué l'expression des gènes codant pour ses deux premières enzymes limitantes, à savoir la glucose-6-phosphate isomérase (GPI) et la glucose-6-phosphate-deshydrogénase (G6PD). Enfin, nous avons quantifié l'expression du gène codant pour la sous-unité α du facteur induit par l'hypoxie (HIF1 α), un des régulateurs transcriptionnels majeurs de la glycolyse dont l'expression est augmentée en condition d'hypoxie, ainsi que l'expression du gène codant pour la porine mitochondriale VDAC de type 1 (VDAC1) pouvant lier HK1 et HK2. HIF1 α et VDAC1 sont, en effet, deux acteurs décrits comme étant impliqués dans le shift métabolique observé lors de l'effet Warburg (32,33).

Finalement, au niveau protéique, nous avons dosé l'activité de l'HK précédemment décrite comme étant induite par le VHC (14) et enzyme dont l'intérêt a été développé précédemment.

Les éléments de glycolyse analysés lors de l'étude sont représentés Figure 4.

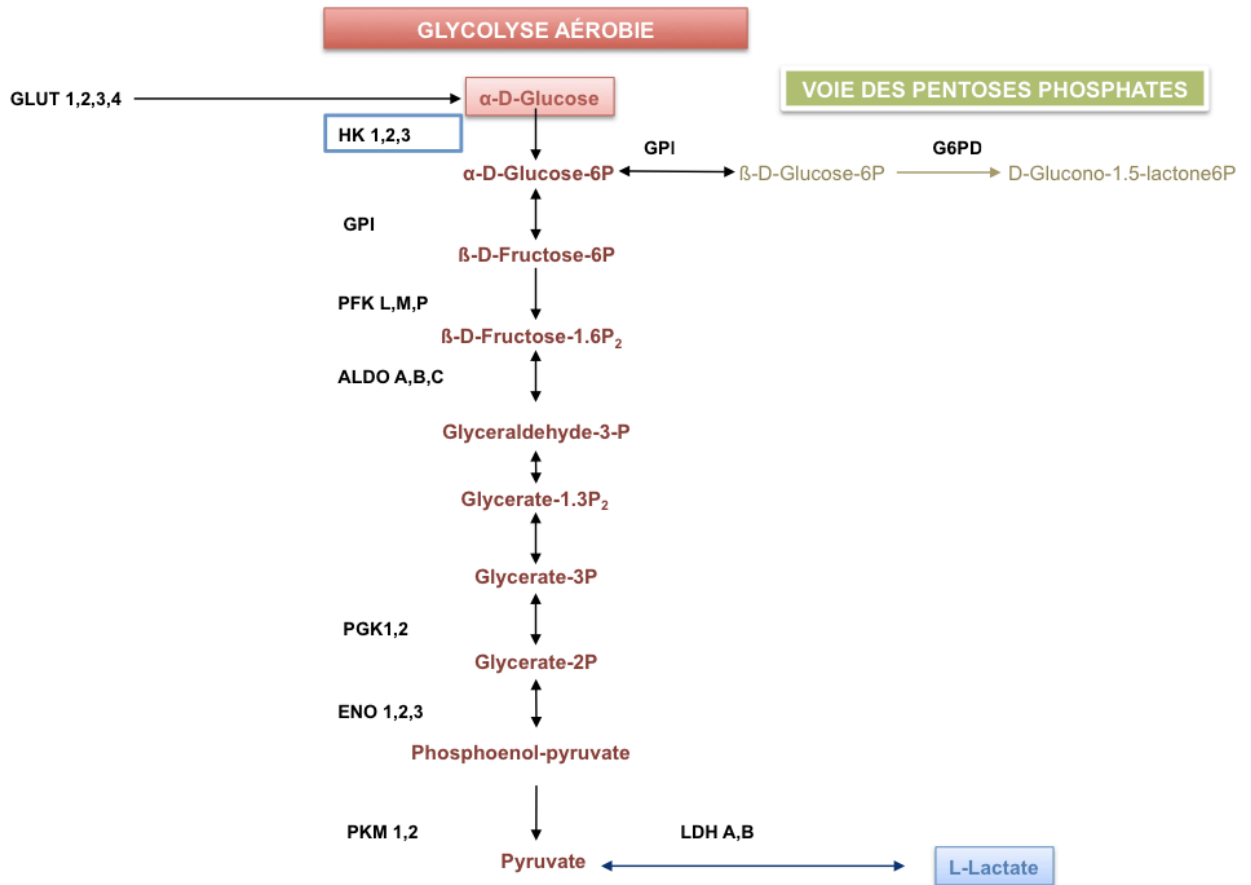


Figure 4. Schéma de la glycolyse aérobie. L'expression des gènes codant les protéines (enzymes et transporteurs) et leurs différents isoformes, représentées en noir, a été quantifiée. Le α -D-glucose (en rouge) et le L-lactate (en bleu), respectivement substrat initial et produit final de la glycolyse aérobie, sont les deux métabolites ayant été dosés. L'activité de l'hexokinase (HK), première enzyme limitante de la glycolyse entourée en bleu a été mesurée. GLUT, transporteur de glucose ; GPI, glucose-6-phosphate isomérase ; PFK, phosphofructokinase ; ALDO, aldolase ; PGK, phosphoglycérate kinase ; ENO, enolase ; PKM, pyruvate kinase de type M comme musculaire ; LDHA ou B, lactate déshydrogénase de type A ou B.

2.3. Modèles viraux étudiés

Pour mettre en place ce screening métabolique portant sur plusieurs niveaux de régulation hypothétiques, nous avons choisi deux modèles viraux très différents aussi bien au niveau de la taxonomie, de la stratégie répliquative que de la physiopathologie : le virus BK et le virus de la grippe, influenza de type A et de sous-type H1N1.

2.3.1. Le virus BK

2.3.1.1. Caractéristiques de l'agent infectieux

2.3.1.1.1. Taxonomie et généralités

Le virus BK fait partie de la famille des *Polyomaviridae* et du genre *Orthopolyomavirus*. Deux autres genres sont décrits dans cette famille, le genre *Wukipolyomavirus* contenant quatre virus humains et le genre *Avipolyomavirus* contenant les polyomavirus aviaires. Les polyomavirus sont de petit virus non enveloppés à ADN circulaire. Ils peuvent entrer en phase de latence sous forme épisomale. On les trouve chez de nombreux hôtes, y compris les oiseaux, les rongeurs, les primates et les humains. Selon les espèces de polyomavirus le tropisme diffère : rein, poumon, peau et sang. À l'exception des espèces aviaires, qui peuvent engendrer des infections aiguës, les polyomavirus engendrent des infections persistantes, le plus souvent asymptomatiques chez leurs hôtes naturels. Cependant, ils peuvent se réactiver en cas d'immunodépression et être responsables de maladies graves. Les deux premières espèces humaines à avoir été caractérisées sont le virus BK et le virus JC. Ils ont été identifiés en 191 (34,35) et nommés d'après les initiales des patients sources. Le virus simien SV 40 non humain faisant aussi partie des orthopolyomavirus, a été introduit dans la population humaine il y a environ 40 ans, après inoculation du vaccin contre la polio contaminé lors de sa préparation sur des cellules simiennes rénales, les cellules Vero (36).

Depuis 2007, neuf nouvelles espèces humaines ont été découvertes (37) (tableau 1). Toutes ont une structure génomique très proche du polyomavirus simien canonique, le SV 40. Néanmoins de légères différences de séquence ayant des répercussions sur les protéines de capsid expliquerait l'éventail des tropismes cellulaires selon les espèces virales. L'attribution du nom de ces nouveaux virus n'est pas codifiée et est fonction du contexte

de leur découverte. Aussi le nom du Karolinska Institute polyomavirus (KIPyV) (38) et du Washington University polyomavirus (WUPyV) (39) découle du centre universitaire où a été fait leur découverte. Le Malawi polyomavirus (MWPyV) (40) et St Louis polyomavirus (STLPyV) (41) ont été nommés d'après la source de l'isolat d'origine. Leur ordre de découverte a permis de nommer les Human polyomavirus 6 (HPyV6), HPyV7 et HPyV9 (42,43). Enfin, le nom du Merkel cells polyomavirus (MCPyV) (44) et du Trichodysplasie spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) (45) découle de la maladie à laquelle ils sont associés. En effet, ces deux virus sont retrouvés à une haute fréquence dans des cancers cutanés très rares. On retrouve dans 80 % des cas de carcinome de Merkel le génome du MCPyV intégré dans l'ADN de la cellule hôte (44). Le processus d'oncogenèse n'est cependant pas systématique comme en témoigne la différence entre la séroprévalence du MCPyV dans la population générale qui s'élève à 65% (46) et la rareté des lésions carcinomateuses.

Aussi, bien que la majorité des polyomavirus semble engendrer des infections bénignes hors contexte d'immunodépression, il semblerait qu'ils aient un pouvoir oncogène. Il a effectivement été montré *in vitro* que les protéines précoces virales ont un pouvoir transformant dans des cellules non permissives dans lesquelles le cycle viral est arrêté précocement. En outre, *in vivo*, on observe chez des rongeurs la formation de tumeurs de types très divers après inoculation du SV40 (47) et du virus BK (48). De plus, les virus JC et BK, ont été détectés de manière plus fréquente dans divers cancers gastro-intestinaux (49) et uro-génitaux (50) comparativement à des tissus sains. Cependant, il n'y a aucune preuve que les génomes viraux soient intégrés dans l'ADN des cellules tumorales et la seule présence d'ADN viral sous forme épisomique est insuffisante pour supporter un rôle causal de ces virus dans la pathogenèse d'un cancer. Finalement, sur la base de « preuves insuffisantes » chez l'homme mais « preuves suffisantes » découlant d'expérimentations animales, l'agence internationale de recherche sur le cancer a classé les virus JC et BK en groupe 2B soit « possiblement cancérogènes pour l'humain » (51).

Genre	Espèce	Date de découverte	Maladie associée	Source d'isolation
<i>Orthopolyomavirus</i>	Virus BK (BKV)	1971	Cystite hémorragique, Néphropathie associée au polyomavirus (PVAN)	Urine, rein, sang
	Virus JC (JCV)	1971	Leucoencéphalite progressive multifocal (LEMP)	Urine, SNC, sang
	Merckel Cell polyomavirus (MCPyV)	2008	Carcinome de Merkel	Lésions cutanées
	Trichodysplasia Spinulosa-associated polymavirus (TSPyV)	2010	Trichodysplasia spinulosa Pilomatrix dysplasia	Lésions cutanées
	Human polyomavirus 9 (HPyV9)	2011	Aucune	Peau
	Malawi polyomavirus (MWPyV)	2012	Aucune	Fèces
	St Louis polyomavirus (STLPyV)	2012	Aucune	Fèces
<i>Wukipolyomavirus</i>	WU polyomavirus (WUPyV)	2007	Aucune	Tissu nasopharyngé
	KI polyomavirus (KIPyV)	2007	Aucune	Tissu nasopharyngé
	Human polyomavirus 6 (HPyV6)	2010	Aucune	Peau
	Human polyomavirus 7 (HPyV7)	2010	Aucune	Peau

Tableau 1. Taxonomie des polyomavirus humains et leur contribution en pathologie humaine.

2.3.1.1.2. Structure et organisation génomique

Comme l'ensemble des polyomavirus, le virus BK est un petit virus d'environ 45 nm de diamètre, non enveloppé dont le génome à ADN double brin circulaire mesure environ 5 kb. L'organisation du génome est hautement conservée parmi les polyomavirus humains. L'unique gène est composé de deux unités de transcriptions, une région précoce et une région tardive transcrites de manière séquentielle.

La région précoce code pour deux protéines, l'antigène grand T (T comme tumeur) et l'antigène petit T, noms attribués en raison de leur taille respective. Le virus BK possède par ailleurs un dérivé de l'antigène grand T résultant d'un épissage alternatif. Ces protéines précoces, notamment l'antigène grand T, ont un rôle critique dans le cycle du virus, en particulier dans la réplication du génome viral. Ces caractéristiques sont décrites de manière plus précise dans le paragraphe dédié au cycle de réplication du virus. Par ailleurs par le jeu d'interactions avec des éléments cellulaires, les protéines précoces ont la capacité de contrôler le cycle cellulaire et de promouvoir la prolifération cellulaire. L'antigène grand T peut en effet se lier et inhiber la protéine (p53) et la protéine du rétinoblastome (pRB), deux facteurs suppresseurs de tumeur (52). Cette caractéristique expliquerait en partie le potentiel oncogène des polyomavirus.

En outre, la région tardive code pour les protéines structurales, VP1, VP2, VP3. La capsidie icosaédrique est formée de 72 pentamères de VP1, constituant la face externe. Chaque pentamère est associé à une molécule de VP2 ou à une molécule de VP3, constituant la face capsidiale interne. L'ensemble du génome viral est représenté Figure 5.

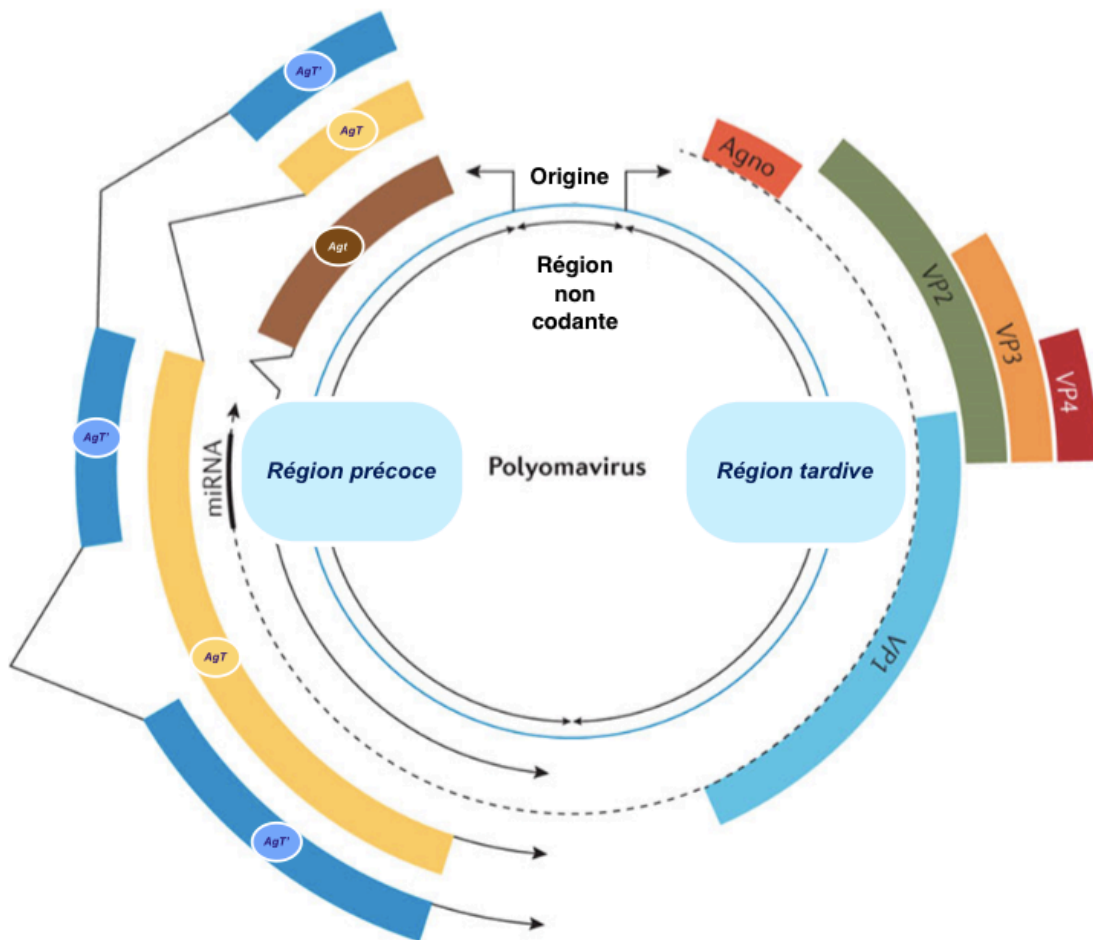


Figure 5. Structure générale du génome des polyomavirus. Le génome est formé d'ADN double brin circulaire comportant trois régions principales : une région de contrôle non codante comprenant les promoteurs précoces et tardifs, les sites d'initiation de transcription et l'origine de réplication; une région précoce codant pour l'antigène grand T (AgT), l'antigène petit t (Agt) et un antigène grand T variant, résultant d'un épissage alternatif (AgT') ; une région tardive codant pour les protéines de capsid virale VP1, VP2, VP3, VP4. VP4 n'a pour l'instant été identifié que chez le virus SV40. Les cadres de lecture pour VP2, VP3 et VP4 sont identiques, mais la traduction commence à des codons d'initiation successifs pour générer les différentes protéines. L'agnoprotéine (Agno) résultant de la traduction d'un transcrite tardif, est une protéine dont la fonction n'est pas clairement établie (adapté de (53)).

2.3.1.1.3. Cycle de réplication viral

- *Récepteurs cellulaires, entrée, décapsidation*

Après attachement d'un pentamère de VP1 à un récepteur cellulaire de nature gangliosidique terminé par deux acides sialiques lié en alpha 2-8 (54,55), le virus BK est internalisé par endocytose médiée par la cavéoline (56). Les cavéosomes alors formés sont transportés au réticulum endoplasmique. Lors du transport du réticulum endoplasmique au cytoplasme le virus subit une décapsidation partielle. Grâce à des signaux de localisation nucléaires situés sur la protéine de capsid résiduelle VP3, les particules sont adressées au noyau. Le génome viral est alors importé à travers les pores nucléaires (57).

- *Expression des gènes précoces*

La région précoce est transcrite dans les heures qui suivent l'entrée du génome viral dans le noyau. Après traduction dans le cytoplasme, l'antigène grand T retourne au noyau, associé au génome viral et aux facteurs cellulaires impliqués dans la réplication. Cette protéine multifonctionnelle est en effet capable de recruter la machinerie de la cellule hôte au cours des différentes étapes du processus de réplication. Les systèmes de culture pour étudier le virus BK sont assez difficiles à mettre au point ce qui explique le manque de données sur son cycle de réplication et sur l'antigène grand T. En revanche, par analogie avec le SV40 qui se reproduit très bien en culture, nous pouvons extrapoler la manière dont l'antigène grand T orchestre la réplication virale. En effet, le gène codant pour l'antigène grand T partage 76% d'homologie de séquence entre ces deux virus.

- *Réplication de l'ADN viral*

L'antigène grand T se fixe sur l'origine de réplication du génome viral, il se polymérise en deux hexamères de part et d'autre de l'origine pour commencer le déroulement et la dénaturation de l'ADN viral double brin grâce à son activité hélicase. L'orchestration du recrutement des facteurs cellulaires au cours du processus est représentée Figure 6.

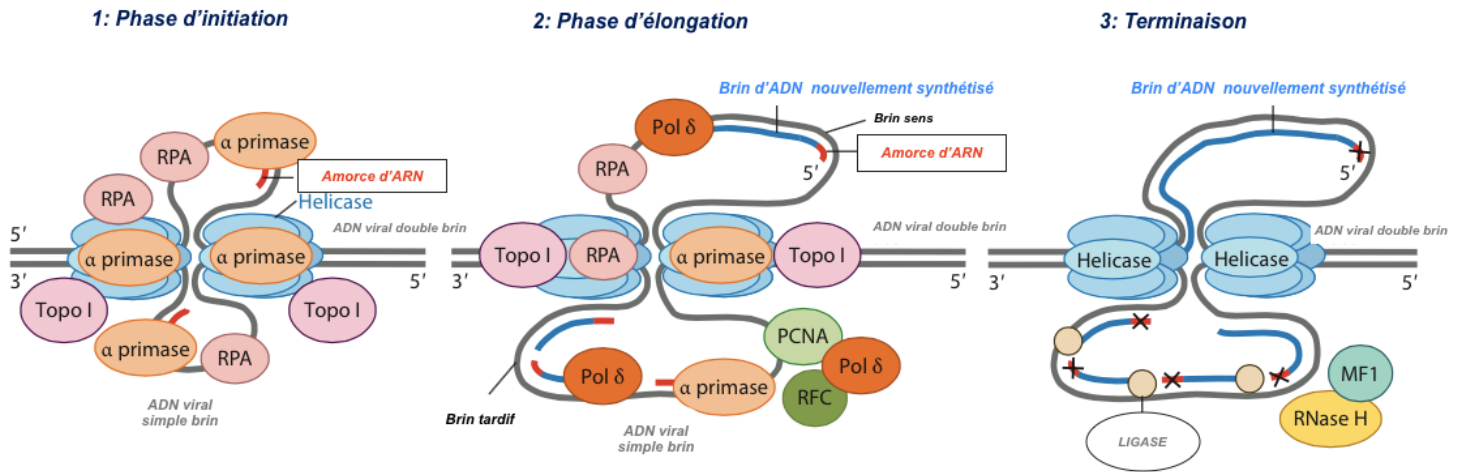


Figure 6. Orchestration de la réplication virale par l'antigène grand T. 1 : Phase d'initiation. L'antigène grand T se polymérise en deux hexamères qui se font face et initie la dissociation de l'ADN double brin (représenté par deux lignes grises parallèles) selon un modèle bidirectionnel. En plus de l'antigène grand T, neuf facteurs cellulaires sont nécessaires pour assurer la réplication. Les protéines cellulaires qui interagissent avec l'antigène grand T à ce stade sont la protéine de réplication A (RPA), l' α primase et la topoisomérase I (Topo I). RPA est une protéine nécessaire au maintien de l'ADN dans sa structure simple brin. L' α primase synthétise les amorces d'ARN d'environ 11 nucléotides, représentées en rouge et qui servent de point de départ à l'élongation menée par la polymérase δ cellulaire (Pol δ). Topo I permet le maintien de la configuration en double hélice de l'ADN en aval en s'affranchissant des distorsion engendrées par la réplication. 2 : Phase d'élongation. De nouveaux facteurs cellulaires sont recrutés lors de cette phase : le facteur de réplication C (RFC) et l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) facilitent le passage de la primase α à la Pol δ et donc la synthèse du nouveau brin d'ADN, représenté en bleu à partir des amorces d'ARN. Pour la synthèse du brin tardif, la primase α doit produire des amorces à plusieurs reprises. 3 : Phase de terminaison. La RNase H et facteur de maturation 1 (MF1), une 5' - 3' nucléase, sont nécessaires pour enlever les amorces. Enfin, l'ADN ligase complète la réplication et ferme de manière covalente les interstices des brins nouvellement synthétisés (adapté de (52)).

Il est important de noter que la réplication des polyomavirus repose essentiellement sur l'arsenal enzymatique de la cellule infectée. En effet, les polyomavirus ont cette caractéristique originale d'être dépourvu d'enzymes virales spécifiques généralement utilisées comme cible thérapeutique à savoir une polymérase ou encore une protéase. L'unique activité enzymatique virale décrite dans cette famille est une activité hélicase portée par l'antigène grand T qui pallie par ailleurs le manque d'activité enzymatique virale par un jeu d'interaction avec des enzymes cellulaires.

- *Expression des gènes tardifs, encapsidation et libération des virions*

Finalement dans un deuxième temps les gènes tardifs sont transcrits puis traduits pour finalement aboutir à l'encapsidation des nouvelles copies du génome viral et à la libération des nouveaux virions. Les principales étapes du cycle de réplication virale sont représentées Figure 7.

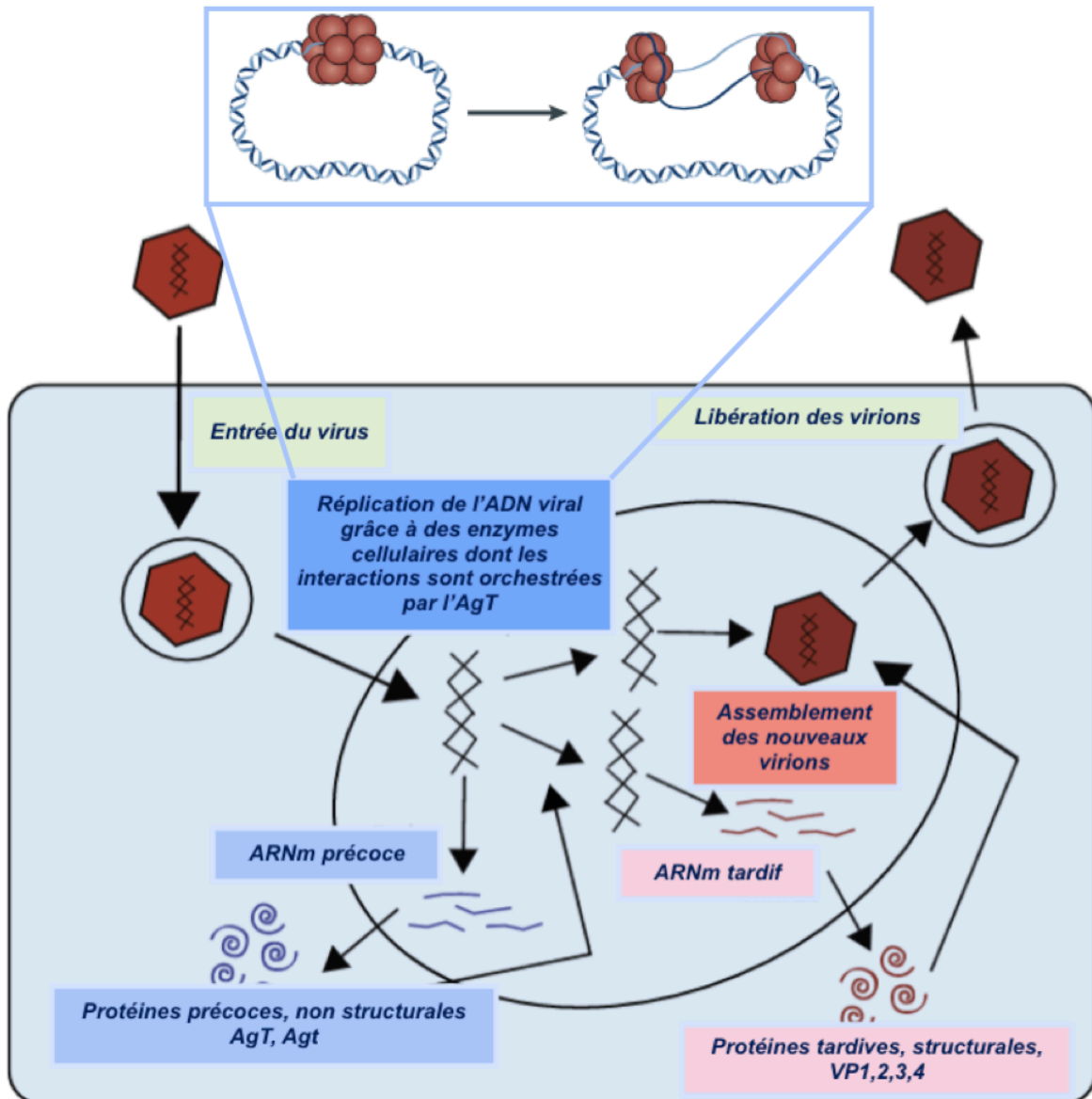


Figure 7. Cycle réplcatif des polyomavirus. Après l'entrée, les particules virales traversent le cytoplasme pour atteindre le noyau dans lequel a lieu la réplcation assurée entre autres par la polymérase δ de l'hôte. La première étape du cycle viral consiste en l'expression des gènes précoces (bleu) codant pour l'antigène grand T (Ag T) et l'antigène petit T (Ag t), nécessaires à la réplcation du génome viral notamment par le recrutement de certaines protéines de l'hôte. La production de protéines structurales, VP1-VP4 (rouge) a lieu dans un second temps avant l'assemblage des nouveaux virions et leur libération dans le milieu extracellulaire (adapté de (37) et du Fields, 4e édition (58)).

2.3.1.1.4. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques

Le virus BK se contracte préférentiellement pendant l'enfance par voie salivaire et/ou respiratoire. Il est largement répandu dans la population générale, la séroprévalence tend vers 90 % (59).

La primo-infection est le plus souvent asymptomatique. Dans de rares cas elle peut être associée à des signes d'infection respiratoire non spécifiques. Le virus atteindrait ses organes cibles après diffusion sanguine. Néanmoins, très peu de données au cours des premiers stades de l'infection sont disponibles en raison de la nature aspécifique du tableau clinique ou plutôt de l'absence des symptômes cliniques. Chez les adultes, le virus se réactive à partir de sites d'infection persistante où il se trouve à l'état latent sous forme épisomale. En raison de la détection du virus BK dans les urines des patients immunodéprimés et à moindre mesure dans les urines des sujets immunocompétents, les cellules épithéliales du rein constituerait le réservoir principal de l'infection latente(59,60).

Si le virus BK se réactive chez l'immunocompétent de façon silencieuse, ces réactivations peuvent engendrer des tableaux cliniques sévères chez les patients immunodéprimés. L'effet cytopathogène notamment sur les cellules épithéliales peut se traduire par des néphropathies tubulo-interstitielles (PVAN pour polyomavirus associated nephropathy) chez les greffés rénaux ou par des cystites hémorragiques (CH) chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). De plus rares cas de sténoses urétrales ont été décrites chez ces deux populations (61).

La PVAN apparaît dans les 6 à 12 mois après la transplantation rénale. La première étape de cette maladie est caractérisée par une réplication virale prolongée et intense dans les cellules épithéliales du rein et des voies urinaires. Elle induit un effet cytopathique engendrant la lyse des cellules épithéliales et la libération du virus dans le sang en raison de lésions de la membrane basale. D'autre part, la migration de cellules de l'immunité dans le tissu interstitiel participent à l'atrophie tubulaire et au développement d'une fibrose interstitielle (62). Ces modifications histologiques s'accompagnent d'un dysfonctionnement progressif du greffon, pouvant être irréversibles dans les derniers stades de la maladie et aboutir à la perte du greffon. Les cellules urothéliales sont également un site de la réplication virale intense et sont la principale source de la virurie (63). Par ailleurs, bien qu'il y ait de faibles quantités d'ADN détectables dans les lymphocytes circulants, la virémie est un bon reflet de la réplication virale dans le tissu rénal et urinaire. Chez un patient séropositif pour le BK virus mais avirémique le

développement d'une PVAN est très peu probable. En revanche, le risque que la réplication du virus évolue vers une PVAN est d'autant plus important que la virémie est élevée et prolongée. Un niveau de 10^4 copies/mL est le seuil internationalement reconnu au-dessus duquel les traitements immunosuppresseurs doivent être réduits (64). Comme la majorité des pathologies virales rencontrées en post transplantation, les facteurs de risque du développement de PVAN comprennent des facteurs liés au donneur, au receveur, au type de greffe ainsi qu'au virus lui-même. Dans le cas du virus BK, l'immunosuppression thérapeutique, en perturbant l'équilibre entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte notamment cellulaire, est le principal facteur favorisant le développement de la néphropathie. L'augmentation de la fréquence des PVAN en post transplantation rénale coïncide effectivement avec l'introduction, à la fin des années 90, de traitements immunosuppresseurs plus efficaces et ciblant l'immunité cellulaire, alliant corticothérapie, agents antiprolifératifs et inhibiteur de la calcineurine (65,66). Toutefois, l'environnement tissulaire semble également participer à la réactivation du virus BK. En effet, les PVAN sont observées de façon quasi exclusive dans le cadre de transplantation rénale avec une prévalence de 1-10% aboutissant à la perte du greffon dans 80% des cas (64). Elles sont en revanche très rarement dans le cadre de transplantations d'autres organes solides ou de greffe de CSH (67). Les thérapies qui ont été fréquemment associés à une virémie post-greffe sont : l'exposition prolongée à des corticoïdes, les conditionnements reposant sur les déplétions lymphocytaires, l'association tacrolimus/mycophénolate mofétil plutôt que l'association ciclosporine/mycophénolate mofétil ou les inhibiteurs de mTOR. D'autres facteurs de risque qui ont été signalés, mais pas toujours observé dans toutes les cohortes de patients, sont ceux liés au donneur (nombre de mésappariements HLA, donneur décédé, donneur séropositif pour le virus BK avec un titre en anticorps élevé), au receveur (âge avancé, sexe masculin, séronégatifs pour le virus BK ou titre en anticorps bas), et à la greffe elle-même (64).

La CH associée au virus BK est caractérisée par l'association d'une dysurie, de douleurs et de degrés divers de l'hématurie. Dans les cas les plus graves, l'hématurie peut conduire à une coagulation, une obstruction des vaisseaux urinaires, une hémorragie et à une insuffisance rénale. Les CH associées au virus BK sont observées dans 5 à 15% des patients dans les deux mois suivant la greffe de CSH (68). D'autres causes de CH dans cette population de patients doivent cependant être prises en compte, à savoir la toxicité iatrogène de la chimiothérapie ainsi que d'autres infections virales comme le CMV ou encore l'ad5. La pathogénèse semble être le résultat de plusieurs facteurs. Tout d'abord les

lésions de la muqueuse urothéliale secondaires aux traitements d'induction fait le lit des l'infection. D'autre part, la réactivation virale favorisée par l'immunosuppression, accentue ces lésions. Enfin dans un environnement inflammatoire avec infiltrat lymphocytaire majeur, les cellules infectées sont détruites par les lymphocytes T cytotoxiques lors de la prise de greffe (69). Le diagnostic de la CH associée au virus BK dans le cadre de la greffe HSC est basé sur la détection du virus dans les urines. Les patients avec une virurie ou une virémie élevée sont plus à risque de développer la pathologie (70).

Des manifestations cliniques bien plus rares ont été décrites chez des patients fortement immunodéprimés comme des méningo-encéphalites, des pneumopathies (71), des infections systémiques avec atteinte vasculaire (72) et des éruptions cutanées (73). En outre, le BK virus serait impliqué dans des atteintes des glandes salivaires chez les patients séropositifs pour le VIH. Ces atteintes sont caractérisées par une infiltration lymphocytaire ainsi qu'une fibrose des glandes salivaires. L'implication du virus BK dans ces manifestations cliniques est objectivée par une forte charge virale dans la salive de ces patients en comparaison avec des patients sains et par la capacité du virus BK à se répliquer dans les cellules épithéliales des glandes salivaires (74,75).

Finalement, le pouvoir oncogène déjà abordé de manière générale pour la famille des polyomavirus, reste controversé et n'a pas été démontré de manière rigoureuse pour le virus BK (76).

2.3.1.2. Justification du choix du modèle viral

Jusqu'à présent, aucune analyse métabolique n'a été réalisée sur ce virus. En revanche deux autres virus appartenant aussi aux polyomavirus semblent avoir un lien avec la glycolyse. En effet, l'expression de l'antigène T, antigène précoce lors de la réplication du virus JC, nécessite un apport de glucose ainsi que l'intégrité de la voie de la glycolyse et des pentoses phosphates. De plus, cet antigène engendrerait une régulation positive de l'expression de HK2 au niveau protéique dans les cellules de tumeurs cérébrales (77). Parallèlement, comme dit précédemment, le virus SV40, augmenterait la glycolyse aérobie (11). Par ailleurs, d'un point de vue pratique, l'infection du virus BK peut être conduite sur des cellules épithéliales primaires humaines de tubule proximal de reins (cellules RPTEC acronyme pour l'anglais Renal Proximal Tubular Epithelial Cells) (78). Le métabolisme basal de ces cellules primaires est peu modifié contrairement aux lignées cellulaires

tumorales. Ceci est un avantage indéniable dans le cadre d'une analyse métabolique. De plus, dans le modèle utilisé et dans les temps d'expérimentation l'infection n'entraîne pas d'effet cytopathogène et de mortalité pouvant biaiser l'interprétation.

Enfin, l'étude de ce virus représente un intérêt clinique et thérapeutique. Compte tenu de l'utilisation croissante de thérapies immunosuppressives dans des contextes de transplantations ou de maladies auto-immunes, ainsi que la capacité de certains polyomavirus à engendrer des pathologies chez ces patients immunodéprimés, il n'est pas incohérent de prédire une augmentation de la fréquence des pathologies associées à ces virus. Or la prise en charge communément appliquée est la réduction de l'immunosuppression car il n'existe aucune molécule antivirale spécifique disponible pour cette famille de virus. L'absence de traitement spécifique est cependant compréhensible. En effet, comme précisé précédemment, les polyomavirus sont dépourvus d'ADN polymérase et de protéase virale spécifiques, cibles fréquentes des antiviraux actuels. Ils n'ont pour seule activité enzymatique qu'une activité hélicase couplée d'une fonction ATPasique et portée par l'antigène grand T. Cette activité enzymatique nécessaire à la réplication, constitue une cible virale éligible au design de nouvelles molécules (79,80). Toutefois, l'inhibition spécifique des hélicases est très difficile à obtenir, ce qui pose un problème de toxicité. Les résultats peu probants incitent à chercher de nouvelles stratégies thérapeutiques, différentes de celles consistant à inhiber directement une enzyme virale. Etant donné que ces virus assurent leur réplication et leur assemblage grâce à l'arsenal enzymatique cellulaire, une idée serait d'empêcher une interaction entre acteurs cellulaires et viraux, nécessaire à l'infection. L'étude de l'interactome hôte-pathogène prend alors toute son importance. Dans le traitement des PVAN, cette idée de stratégie thérapeutique peut, à ce propos, être illustrée par l'usage empirique des fluroquinolones, antibiotiques inhibiteurs de topoisomérase bactérienne. Le mécanisme hypothétique reposerait sur l'inhibition des topoisomérases cellulaires obtenue à forte dose de fluoroquinolones. Cette inhibition déstabiliserait alors le complexe de réplication du virus BK empêchant une réplication efficace. Cependant, hormis quelques patients initiaux chez qui des diminutions de charge virale ont été observées (81), l'inhibition de la réplication virale n'est véritablement observée qu'*in vitro* (82). Deux études récentes randomisées en double aveugle ont en effet montré que la lévofloxacine n'est pas efficace dans les PVAN, tant au niveau préemptif (83) que curatif (84).

2.3.2. Le virus influenza de type A

2.3.2.1. Caractéristiques de l'agent infectieux

2.3.2.1.1. Taxonomie et généralités

A la différence du BK virus, le virus influenza de type A (IAV) est un virus enveloppé, à ARN segmenté. Il appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et est l'unique espèce du genre *Influenzavirus A*. Il est responsable des gripes humaines au côté des virus influenza de type ou genre B et C. Néanmoins il est le seul à pouvoir engendrer des gripes animales. En effet, les oiseaux et les porcs sont des réservoirs de l'IAV. Les trois types ou trois genres A, B ou C se distinguent d'un point de vue antigénique par leur protéine de matrice (M1) et leur nucléoprotéine (NP). L'IAV et le virus de type B entraînent une forte morbi-mortalité dans la population humaine. Ils sont la cause d'une charge financière considérable et constituent une problématique de santé publique majeure. En revanche le virus influenza de type C ne cause que des épidémies sporadiques de maladies respiratoires le plus souvent bénignes chez l'enfant.

L'IAV possède deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) qui permettent l'identification de sous types. 16 HA et 9 NA ont été décrites. Chez l'homme, les deux sous-types les plus répandus sont les sous-types H1N1 et H3N2. L'acquisition progressive de mutations dans ces glycoprotéines sous la pression de sélection immunitaire et en raison de la faible fidélité de l'ARN polymérase virale, peut être responsable de glissement antigénique à l'origine des épidémies hivernales. De manière plus rédhibitoire, lors de co-infections par deux souches d'IAV pouvant provenir d'hôtes d'espèces différentes, il est possible d'observer au moment de l'assemblage des nouveaux virions, des réassortiments des segments d'ARN appartenant aux différents virus infectants. Ces nouveaux réassortiments peuvent être à l'origine d'une recombinaison antigénique nouvelle des glycoprotéines de surface. En l'absence d'immunité préexistante dans la population générale, ces cassures antigéniques sont à l'origine de pandémies.

La nomenclature des souches Influenzavirus se fait selon le schéma suivant : genre (A, B, C)/ HxNy si A/ hôte d'origine si non humain/lieu d'origine/numéro de cahier/année d'isolement. Le virus influenza de type A, en particulier la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 (PR8), a fait l'objet de notre deuxième étude métabolique.

2.3.2.1.2. Structure et organisation du génomique

L'IAV est un virus à ARN segmenté, présentant 8 simples brins d'ARN monocaténaire de polarité négative de 890 à 2 341 nucléotides de long. Le génome viral code pour 11 à 12 protéines : deux protéines non structurales codées par le segment NS, la protéine d'exportation nucléaire (NEP, également connu sous le nom NS2) et la protéine non structurale 1 (NS1) antagoniste de la réponse antivirale de l'hôte ; la protéine de matrice M1 et le canal ionique M2, toutes deux codées par le segment de M; l'HA, protéine de liaison à l'acide sialique qui est le récepteur cellulaire; la NA, hydrolysant cette liaison; la nucléoprotéine (NP) et les composants du complexe ARN polymérase ARN dépendante (PB1, PB2 et PA), tous exprimés par leur segments respectifs du génome; enfin la protéine nouvellement identifiée N40, exprimée à partir du segment PB1 et dont la fonction reste mal comprise. De plus, certains virus expriment la protéine PB1-F2 pro-apoptotique qui est codée par un deuxième cadre de lecture dans le segment PB1. À l'intérieur du virion, chacun des huit segments viraux forme un complexe viral ribonucléoprotéique (RNP): l'ARN viral est enroulé autour de NP, ensemble lié au complexe de la polymérase virale. Le génome et les protéines virales sont représentés Figure 8.

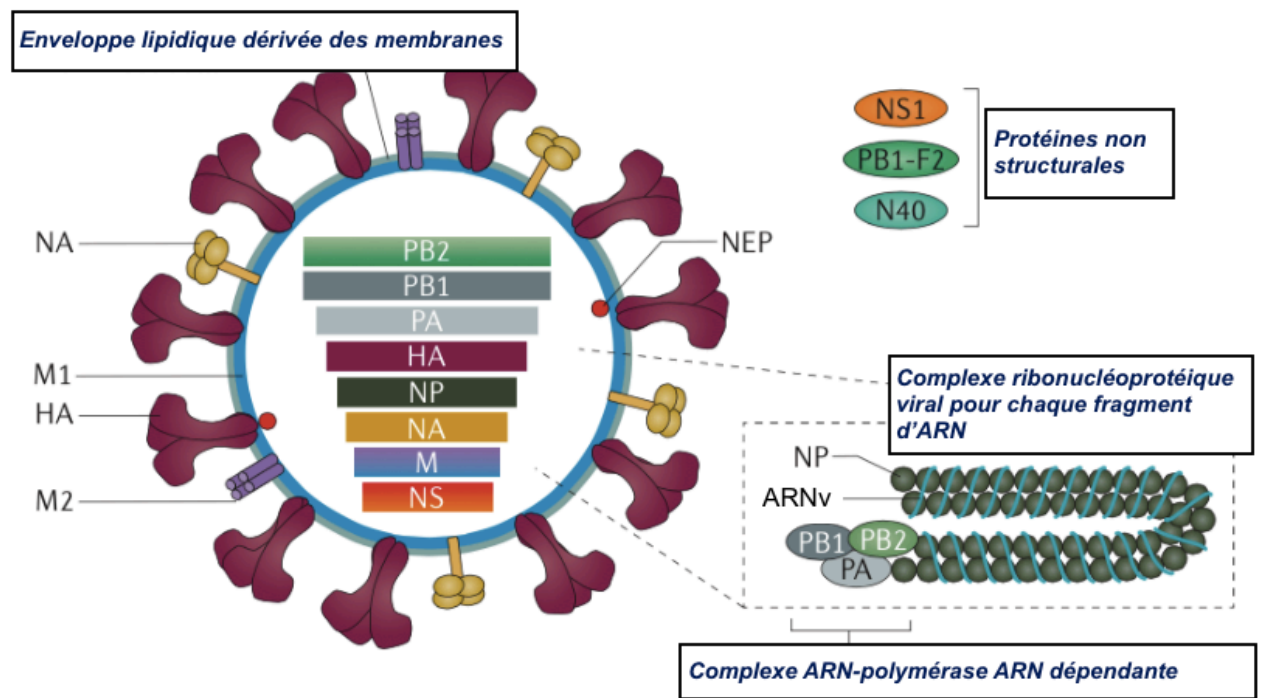


Figure 8. Génome du virus de la grippe et protéines associées. Les segments 1, 3, 4, 5 et 6 codent chacun une protéine virale, à savoir respectivement, la protéine basique 2 (PB2), la protéine acide (PA), l'hémagglutine (HA), la nucléoprotéine (NP) et la neuraminidase (NA). Les segments 7 et 8 produisent deux ARN messagers par épissage alternatif et codent ainsi chacun deux protéines différentes : la protéine de matrice M1 et le canal ionique M2 pour le segment 7, la protéine non structurale NS1 et la protéine d'export nucléaire (NEP) pour le segment 8. Enfin, le segment 2 code la protéine basique 1 (PB1), mais chez certaines souches, une deuxième phase ouverte de lecture permet aussi de coder un petit polypeptide nommé PB1-F2, voire une troisième protéine, N40, correspondant à la protéine PB1 tronquée en N-terminal. Chaque segment d'ARN viral (ARNv) est sous la forme d'un complexe viral ribonucléoprotéique associé à NP et au complexe polymérasique (PB1, PB2 et PA), représenté en bas à droite sur le schéma.

2.3.2.1.3. Cycle de réplication viral

- *Récepteurs cellulaires, entrée, décapsidation*

L'entrée du virus dans la cellule hôte se fait par endocytose à la suite de l'attache de l'HA à des récepteurs cellulaires d'acides sialiques. Le clivage de l'HA par des protéases cellulaires est nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et l'acidification de ces vésicules permet la libération des RNP dans le cytoplasme (85). Grâce à des signaux de localisation nucléaire portés par la protéine NP, les RNP sont transportés dans le noyau de la cellule hôte, où le complexe ARN polymérase ARN dépendante (PB1, PB2, PA) réalise à la fois la transcription des gènes viraux et la réplication de l'ARN viral (ARNv). Pour note, le fait que la réplication s'établisse dans le noyau est un élément original pour un virus à ARN ; en effet la majorité des virus à ARN assure le cycle de réplication dans le cytoplasme. De nombreuses interactions entre les protéines nucléaires et les facteurs de l'IAV ont été caractérisées mais leur rôle fonctionnel est mal compris (86).

- *Transcription des ARNm viraux : le cap-snatching*

La transcription conduit à la production d'ARNm viraux avec une coiffe en 5' et une queue poly (A) en 3'. Cependant le complexe polymérasique du virus de la grippe n'est pas capable de coiffer directement ses ARNm viraux. Aussi, il est obligé d'utiliser la coiffe des pré-ARNm nucléaires de la cellule infectée. La PB2 reconnaît la coiffe en 5' des ARNm cellulaires nouvellement synthétisés et la PA grâce à son activité endonucléasique clive à quelques nucléotides en aval de la coiffe. Ces fragments d'ARNm cellulaire coiffés sont ensuite utilisés comme amorces pour initier la transcription des ARNm viraux (87). Ce phénomène est appelé cap-snatching et aboutit à une diminution drastique de la synthèse des protéines de la cellule infectée par perte d'intégrité des ARNm cellulaires (88).

- *Réplication de l'ARN viral*

Par un mécanisme distinct, l'ARN viral (ARNv) de polarité négative est répliqué en ARN positif qui sert de matrice intermédiaire pour assurer la néosynthèse de nombreuses copies d'ARNv.

- *Assemblage et libération des virions*

Après la formation des RNP dans le noyau, M1, NEP et NP assure leur transport vers le cytoplasme. Ces complexes sont alors dirigés vers le site d'assemblage au niveau de la membrane plasmique où HA et NA ont été accumulées. M1 interagit avec les parties cytoplasmiques de glycoprotéines, conduisant à l'assemblage et au bourgeonnement des virions. Enfin la libération des virions découle de l'hydrolyse des acides sialique par la NA. Enfin, après avoir produit des milliers de nouvelles particules virales, la cellule est lysée. Les différentes étapes du cycle réplcatif sont représentées Figure 9.

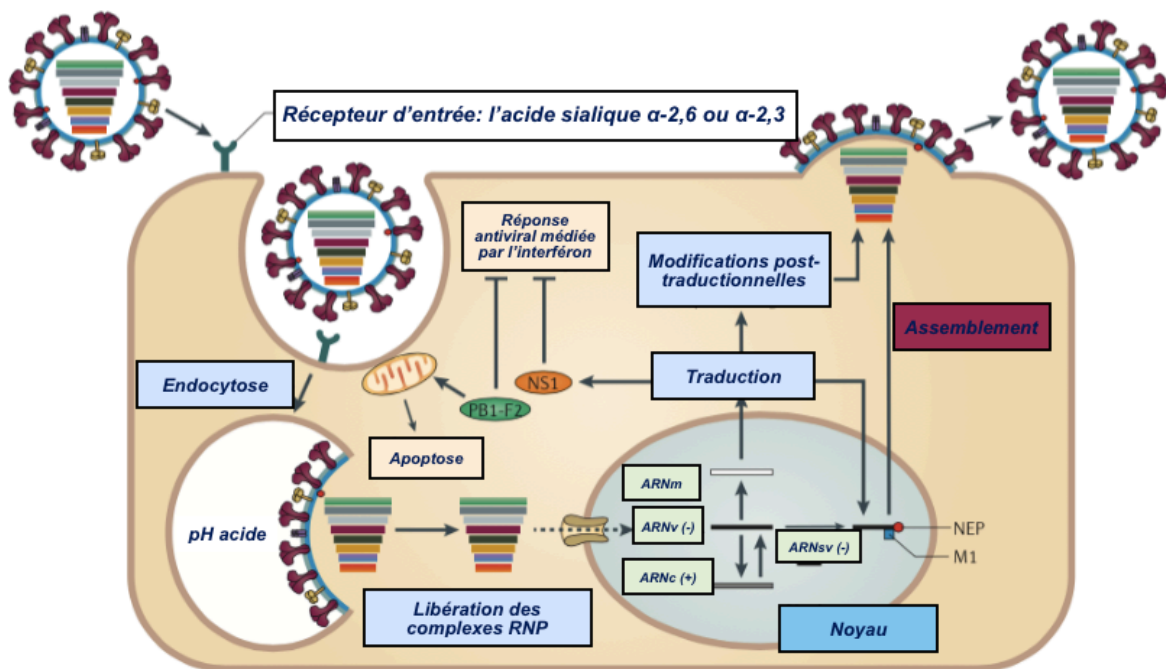


Figure 9. Cycle répliatif du virus de la grippe. Lors des premières étapes de la réplication, l'hémagglutinine se lie à la fraction terminale de l'acide sialique α -2,6 ou α -2,3 ; le virus pénètre alors dans la cellule par endocytose. Après acidification de l'endosome, les complexes RNP sont libérés dans le cytoplasme puis transportés et transcrits dans le noyau. L'ARN polymérase ARN-dépendante transcrit et réplique l'ARN viral de polarité négative (ARNv (-)), donnant lieu à trois types de molécules d'ARN: un ARN complémentaire de polarité positive (ARNc (+)) qui sert de matrice pour générer davantage d'ARN viral; des petits ARNs viraux de polarité négative (ARNsv (-)) qui régularaient le passage de la transcription à la réplication et enfin les ARNm viraux qui sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits. Les protéines virales qui sont nécessaires à la réplication et à la transcription, sont adressées au noyau, et les complexes viraux ribonucléoprotéiques (RNP) nouvellement formés sont exportés vers le cytoplasme grâce à la protéine de matrice M1 et la protéine d'exportation nucléaire (NEP). A la suite de l'assemblage des nouveaux virions et de leur bourgeonnement, la libération est assurée par la neuraminidase qui détruit la liaison entre les acides sialiques cellulaires et les glycoprotéines virales (adapté de (89)).

2.3.2.1.4. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques

A la chronicité des infections du BK virus s'oppose le caractère aigu des infections par l'IAV. Le virus se propage par les aérosols et les gouttelettes. En outre, il peut longtemps persister dans l'air et sur les mains. Les symptômes respiratoires associés à l'infection sont principalement liés à la réplication du virus dans l'épithélium des voies respiratoires. Après avoir produit un grand nombre de virus, les cellules épithéliales sont lysées, ce qui aboutit à une desquamation de la muqueuse respiratoire. Les symptômes systémiques comme la fièvre, les myalgies et les malaises résultent de la réponse immunitaire innée entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF alpha (90).

De manière générale, la grippe est une infection respiratoire spontanément résolutive. Les souches qui circulent communément se limitent aux voies respiratoires sans propagation systémique. Ce tropisme tissulaire s'explique en partie par la localisation des récepteurs de l'HA des souches humaines (acides sialiques lié en α 2,6) au niveau des voies aériennes supérieures mais aussi par le fait que les protéases requises pour le clivage de l'HA nécessaire à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, sont limitées à l'épithélium des voies respiratoires et des poumons. Cependant des mutations de l'HA peuvent engendrer une nouvelle affinité pour d'autres récepteurs situés en bas de l'arbre bronchique (acides sialiques lié en α 2,3) mais surtout provoquer l'apparition d'un site de clivage multibasique pouvant être reconnu par des protéases intracellulaires ubiquitaires et ainsi être responsables de la propagation du virus (91). D'autre part, ces mutations peuvent engendrer des variations antigéniques rendant l'immunité adaptative inefficace par apparition de nouvel épitope jamais rencontré jusqu'alors. Ces déterminants viraux ne sont pas les seuls à moduler le pouvoir pathogène de l'IAV. En effet, les variabilités de génotypes du PB1, PB2, PA et de NP ont des répercussions sur la processivité du complexe de l'ARN polymérase en fonction du type de cellule infectée (92). Certaines mutations permettent le fonctionnement du complexe enzymatique à des températures plus élevées que le 33°C moyen des voies respiratoires supérieures et sont donc en faveur de la diffusion du virus dans les voies respiratoires basses (93) et *a fortiori* dans l'organisme. En outre d'autres éléments viraux comme NS1 et PB1-F2 sont des antagonistes de la réponse interféron (94).

Par ailleurs le pouvoir pathogène de l'IAV est aussi déterminé par de nombreux facteurs de l'hôte. Par delà des facteurs prédisposants tels que le terrain et les co-morbidités, on observe dans les tableaux cliniques sévères un emballement de la réponse inflammatoire

qui se maintient de manière anormale après la phase initiale de l'infection. La réponse cytokinique pro-inflammatoire accrue peut engendrer une surexpression ectopiques des protéases cellulaires pouvant cliver HA dans divers organes notamment les cellules endothéliales (90). On parle du « cycle virus influenza-cytokines-protéase » (95). Ce phénomène étend le tropisme du virus et joue donc un rôle important dans la pathogenèse des infections sévères à IAV telles que les pneumonies, les myocardites, les infarctus aigus du myocarde (96, 97), les encéphalites chez l'enfant (98) et les défaillances multi viscérales avec hyperperméabilité vasculaire (99). De plus par des interactions directes ou indirectes avec des protéines virales, certaines protéines de la cellule infectée sont nécessaires à différentes étapes du cycle répliatif et peuvent donc influencer l'efficacité de l'infection (100, 101).

2.3.2.2. Justification du choix du modèle viral

A la différence du virus BK, l'IAV possède des protéines virales pourvues d'une activité enzymatique et qui constituent de potentielles cibles thérapeutiques. Cependant l'arsenal thérapeutique disponible à l'heure actuelle se limite aux inhibiteurs de neuraminidases voire à l'interferon ou encore la ribavirine (102), ces deux dernières molécules n'étant pas spécifiques d'une cible virale particulière. En outre, les inhibiteurs de neuraminidases semblent manquer d'efficacité (103). D'autre part ces molécules agissent en empêchant la libération des virions. Le fait que ces molécules interviennent à la fin du cycle de réplication implique une administration précoce du traitement pour limiter le plus possible le nombre de cellules infectées. Selon les recommandations actuelles, l'administration doit être réalisés dans les 48H après le début des symptômes, temps au delà duquel l'efficacité diminue de manière significative, les cellules étant déjà largement infectées voire détruites. Peu de solutions thérapeutiques existent pour les patients présentant des symptômes progressifs après la phase initiale de l'infection, souvent liés à des tableaux cliniques sévères. Enfin, en raison de la faible fidélité du complexe de l'ARN polymérase de l'IAV, l'apparition des mutations de résistance sur la neuraminidase avec ou sans pression de sélection thérapeutique n'est pas négligeable (104, 102,105)et constitue un réel problème.

Ici, les problématiques principales ne sont donc pas l'absence de cibles thérapeutiques virales comme pour le BK virus mais le taux de mutations accrues susceptibles de provoquer un échappement thérapeutique ainsi que l'absence de traitement

après la phase initiale de l'infection. Dans ce contexte, les facteurs de l'hôte sont des cibles thérapeutiques idéales. Ils sont, en effet, bien moins susceptibles que les protéines virales à muter sous une pression sélective médicamenteuse. De plus, étant donné leur rôle primordial dans la pathogénèse des tableaux cliniques sévères pouvant se développer dans les phases avancées de l'infection (95), leur intérêt n'est qu'accentué.

Considérant le grand nombre d'infections virales modulant la glycolyse, nous avons ciblé cette voie pour tenter de mettre en évidence d'éventuels points d'interaction hôte-pathogène. Par ailleurs, bien que l'IAV ait déjà fait l'objet d'études métaboliques, les données obtenues *in vitro* sont contradictoires et incitent à clarifier ses effets sur le métabolisme cellulaire glycolytique (106, 107, 108, 109). En outre, pour faire un lien avec ce qui est observé cliniquement, il faut préciser que les troubles métaboliques sous-jacents secondaires ou primaires, toutes étiologies confondues, constituent un des facteurs de risque favorisant le développement des infections sévères à IAV (110). Finalement, des études menées *in vivo* chez la souris ont montré que le cycle « virus influenza-cytokine-protéase » observé après la phase initiale de l'infection par la souche PR8 et responsable de tableaux cliniques sévères, induit des troubles métaboliques majeurs ne faisant que surenchérir la sévérité des symptômes. Ce phénomène est à l'origine d'un véritable cercle vicieux. Les cytokines pro-inflammatoires inhibent de manière indirecte la pyruvate déshydrogénase (PDH), première enzyme du cycle de Krebs, par surexpression de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4). La phosphorylation oxydative ne se fait plus et on observe une déplétion en ATP qui à son tour est en partie responsable d'une augmentation de libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces troubles métaboliques se traduisent par une diminution de la glycémie couplée à une augmentation de la lactatémie. Fait remarquable, l'inhibition de la PDK4 normalise chez les souris infectées non seulement les troubles métaboliques observés mais arrête la tempête cytokinique, la surexpression des protéases et la réplication virale pour finalement aboutir à une baisse significative de la mortalité (111).

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Cultures cellulaires

Les cellules RPTE (Lonza) ont été maintenues dans du milieu de croissance spécifique des cellules épithéliales rénales (REGM, Lonza) supplémentés de facteurs de croissance comme il a été décrit précédemment par Abend et *al* (112). Les cellules Vero (American type culture collection, ATCC) ont été cultivées comme précédemment décrit par Jiang et *al* ainsi que par Broekema et *al* (113,114).

Les cellules humaines d'adénocarcinome du poumon A549 (ATCC) ainsi que les cellules Madin Darby canine kidney (MDCK, ATCC) ont été cultivées dans du milieu standard, Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) supplémenté avec 50 IU/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine ainsi que 10% sérum de veau foetal (SVF) inactivé à la chaleur. Toutes les cellules ont été cultivées à 37 ° C avec 5% de CO₂ dans un incubateur humidifié.

3.2. Productions des stocks viraux et titrations

Le stock de virus BK, souche Dunlop, a été obtenu par propagation en flasque T75 sur cellules Vero.

Le titre du virus en équivalent génomique a été obtenu par une PCR quantitative en temps réel (RTqPCR) grâce à une sonde fluorescente (TaqMan, Applied Biosystems), après extraction à l'aide du système automatisé NucliSENS® easyMAG (bioMérieux). Les amorces (Eurofins MWG Operon) et la sonde ont été désignées de manière à détecter la région conservée N-terminale de l'AgT(115) : amorce sens, 5'-AGCAGGCAAGGGTTCTATTACTAAAT-3'; amorce anti-sens, 5'-GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA-3'; sonde, 5'-CCTAAAGACTTTCCTCTGAT-3', marquée en 5' par la 6-carboxyfluoresceine et en 3' par le quencher MGB (Minor Groove Binder). La quantification a pu être réalisée grâce à une gamme plasmidique.

Le stock de la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 (PR8) a été obtenu par propagation en flasque T75 sur les cellules Madin Darby canine kidney (MDCK). Le virus

a été dilué dans un milieu d'infection composé de DMEM supplémenté de 50 IU/mL de pénicilline, de 50 mg/mL de streptomycine et de 2 µg/mL de trypsine-TPCK. Après 1h d'incubation à 37°C l'inoculum a été retiré et changé par du milieu d'infection. La récolte virale s'est faite à J3 post infection après s'être assuré d'un effet cytopathique notoire.

Le titrage du stock a été réalisé par la méthode des plages de lyse. 3 jours après ensemencement en P6, les monocouches confluentes de MDCK ont été inoculées avec des dilutions sérielles du stock viral (pas de 5) sous 500 µL pendant 1h30 à 37°C en présence de trypsine-TPCK. Après élimination de l'inoculum et lavage, les cellules ont été recouvertes d'un milieu solide et incubées 3 jours à 37°C. Après fixation au formaldéhyde 4% et élimination du milieu solide, les plages de lyse ont été révélées par coloration Giemsa/Cristal violet et comptées.

3.3. Infections virales et récoltes des échantillons

Les cellules RPTE ont été ensemencées en plaques de 24 puits (P24) préalablement coatées au collagène ou en flasque T75 en vue du dosage d'activité enzymatique de l'HK. Quelques jours avant l'infection les facteurs de croissance ont été retirés de manière à ne pas interférer sur les analyses métaboliques ultérieures. A 90% de confluence les cellules ont été infectées par le stock viral du BK virus dilué au 1 :10 dans un milieu d'infection composé du milieu REGM supplémenté de 2% de SFV et de 1% de pénicilline et de streptomycine. Après 4h d'incubation à 37°C l'inoculum a été éliminé, les cellules de nouveau lavées puis incubées dans le milieu d'infection à 37°C sous 5% de CO₂. La récolte des surnageants et des culots cellulaires a été réalisée 2, 3 et 5 jours (J2, J3 et J5) après l'infection (Figure 10).

Les cellules A549 ont été ensemencées en plaque de 6 puits (P6). A 90% de confluence les cellules ont été lavées au DMEM puis infectées avec la souche PR8 à une multiplicité d'infection (MOI) de 3 dans le milieu d'infection suivant : DMEM supplémenté de 1% de pénicilline et de streptomycine sans SVF ni trypsine-TPCK. Après 1h d'incubation à 37°C l'inoculum a été éliminé, les cellules de nouveau lavées puis incubées dans le milieu d'infection à 37°C sous 5% de CO₂. La récolte des surnageants et des culots cellulaires a été réalisée 20 heures post infection (Figure 11).

Pour les deux protocoles d'infection, lors des récoltes, les surnageants de culture ont été centrifugés pour éliminer tout débris cellulaire, vortexés, aliquotés et stockés à -80°C au vue des analyses métaboliques ultérieures. Les cellules ont été comptées en cellules de Malassez et la viabilité a été appréciée par coloration au bleu trypan. De plus, dans chacun des cas, des puits ont été réservés à l'immunofluorescence indirecte (IFI) et à l'analyse du milieu sans cellule permettant d'avoir des concentrations en métabolites de référence.

3.4. Immunofluorescence indirecte comme témoin d'infection

Trois jours après l'infection par le virus BK les cellules RPTE ont été fixées au méthanol. La coloration a été réalisée à l'aide d'un anticorps de souris monoclonal anti-AgT (1 : 50) ou d'un anti-VP1 (1 : 1000) (Merck Millipore), chacun couplé à un anticorps secondaire fluorescent composé du fragment F(ab)₂ anti-souris marqué avec le fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes) (Figure 10).

20 heures après l'infection par la souche PR8 les cellules A549 ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 30 minutes puis perméabilisées avec 0,5% de triton X100. La coloration a été réalisée à l'aide d'un anticorps de souris monoclonal anti-nucléoprotéine (anti-NP, 1 : 100), couplé au même anticorps secondaire décrit ci-dessus (1 : 4000) (Figure 11).

Pour chaque IFI, les noyaux ont été contre-colorés au Hoechst et toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Axioplan LSM510 v3.2, Zeiss) et les photographies ont été prises à l'aide de LSM image Browser (Zeiss).

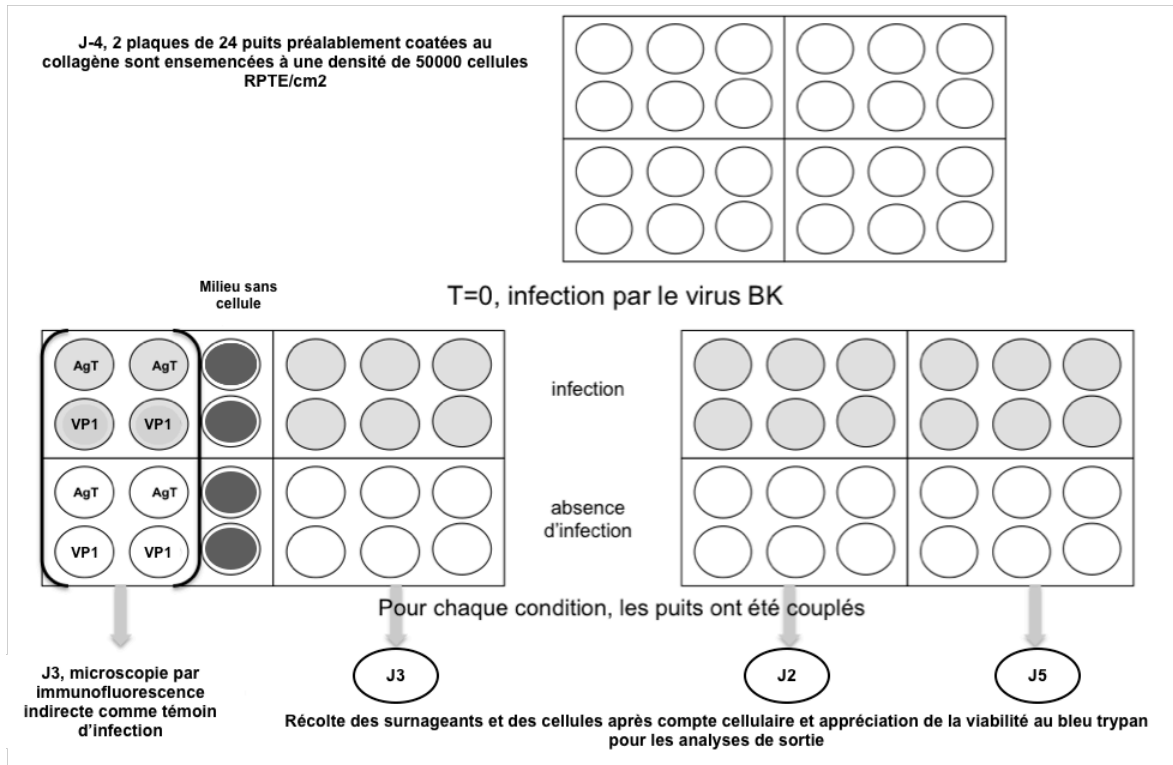


Figure 10. Schéma des étapes expérimentales menées pour l'étude du virus BK avant les analyses métaboliques. Les puits marqués AgT et VP1 correspondent aux puits pour lesquels a été réalisé une immunofluorescence indirecte utilisant respectivement des anticorps dirigés contre l'antigène grand T précocement exprimée et la protéine de capsid majoritaire VP1 exprimée de manière tardive.

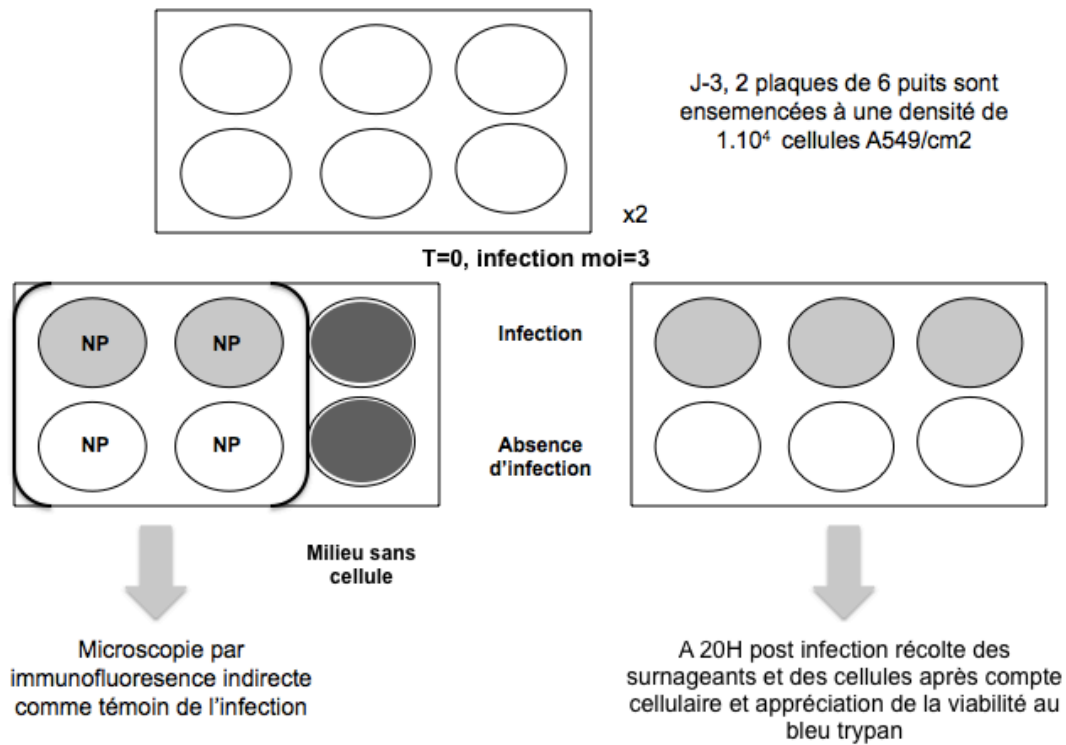


Figure 11. Schéma des étapes expérimentales menées pour l'étude du virus influenza de type A avant les analyses métaboliques. Les puits marqués NP correspondent aux puits pour lesquels a été réalisé une immunofluorescence indirecte utilisant des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine virale NP.

3.5. Dosage biochimique du glucose et du lactate

Le glucose et le lactate ont été dosés sur les surnageants, récoltés comme précédemment décrit, sur le Système Dimension Vista ® (Siemens).

Le glucose a été dosé par une méthode adaptée de la méthode de l'hexokinase-glucose-6-phosphate-déshydrogénase selon laquelle l'HK catalyse la phosphorylation du glucose en présence d'ATP pour former du G-6-P. Ce produit est par la suite oxydé par la G6PDH en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour produire du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). Une mole de NAD est réduite en une mole de NADH pour chaque mole de glucose présente. L'absorbance liée au NADH, et ainsi la concentration en glucose, sont déterminées à l'aide d'une méthode de bichromatisme en point final aux longueurs d'onde de 340 et 383 nm.

Le lactate a été dosé selon une adaptation de la méthode de Marbach et Well qui repose sur l'oxydation du lactate en pyruvate (116). La lactate déshydrogénase catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate grâce à la réduction du nicotinamide NAD en NADH. De la même manière que pour le dosage du glucose, une mole de NAD est réduite en une mole de NADH pour chaque mole de lactate présente. L'absorbance liée au NADH, et ainsi la concentration en lactate, sont déterminées à l'aide d'une méthode de bichromatisme en point final aux longueurs d'onde de 340 et 383 nm.

3.6. Design des amorces

Les amorces ont été désignées de manière à amplifier l'ensemble des variants pour chaque gène. Les séquences communes des transcrits et de leurs variants ont été déterminées à l'aide du logiciel ClustalW2.

Le logiciel Primer Blast, outil précédemment décrit par Ye, J. *et al* (117), a été utilisé pour sélectionner des amorces spécifiques dans ces parties communes. Pour plus de prudence, les amorces retenues les plus spécifiques ont été soumises au logiciel biosoft beacon designer pour apprécier d'une autre manière le risque de formation de structures secondaires, source de mauvaise amplification.

Finalement, pour vérifier de la spécificité des séquences amplifiées, les amorces sélectionnées ont été soumises à l'algorithme BLAST (acronyme pour l'anglais Basic

Local Alignment Search Tool) disponible sur le site internet du NCBI (acronyme pour l'anglais National Center Biotechnology Information, Centre américain pour les informations biotechnologiques). Un alignement avec des séquences autres que la séquence à amplifier conduisait au rejet des amorces candidates.

En moyenne par transcrit, 1 à 2 paires d'amorces sélectionnées *in silico*, ont été retenues pour la validation *in vitro*. Lors de cette validation *in vitro*, la spécificité des amplicons obtenus a été appréciée. Par ailleurs, pour chaque paire d'amorces, le domaine de linéarité ainsi que l'efficacité ont été déterminés par une gamme de dilution. Les séquences des amorces finalement utilisées dans cette étude figurent dans le Tableau 1.

	Gènes (gene iD)	Amorces	Produits PCR (pb)	Origine	Efficacité
Gènes d'intérêt	HK1 (3098)	5'-GCCTCTTATTGAAGGGCGG-3' 5'-GACACAGTCATCATCGGACG-3'	158	Design maison	1,99
	HK2 (3099)	5'-TCCCCTGCCACCAGACTA-3' 5'-TGGACTTGAATCCCTTGGTC-3'	66	Design maison	1,86
	HK3 (3101)	5'-CATCGTGGACTTCCAGCAGAAG-3' 5'-CTTGGTCCAGTTCAGGAGGATG-3'	121	ORIGENE	1,97
	GPI (2821)	5'-GCTGCCACATAAGGTCTTTGA-3' 5'-CCAAGGCTCCAAGCATGAAT-3'	86	Design maison	1,93
	PFKM (5213)	5'-GCTTCTAGCTCATGTCAGACCC-3' 5'-CCAATCCTCACAGTGGAGCGAA-3'	120	ORIGENE	1,98
	PFKL (5211)	5'-AAGAAGTAGGCTGGCAGCAGCT-3' 5'-GCGGATGTTCTCCACAATGGAC-3'	113	ORIGENE	1,92
	PFKP (5214)	5'-AGGCAGTCATCGCCTTGCTAGA-3' 5'-ATCGCCTTTCGACATCCTGAG-3'	130	ORIGENE	1,92
	G6PD (2539)	5'-ACGGCAACAGATACAAGAACG-3' 5'-GCAGTGGGGTGAAAATACGC-3'	135	Design maison	1,96
	ALDOA (226)	5'-GTCCCTTCCCCAAGTTATCA-3' 5'-TAGTCTCGCCATTTGTCCCTG-3'	96	Design maison	1,98
	ALDOB (229)	5'-AGCCTCGCTATCCAGGAAAACG-3' 5'-TGGCAGTGTTCAGGTCATGGT-3'	128	ORIGENE	1,97
	ALDOC (230)	5'-CATTCTGGCTGCGGATGAGTCT-3' 5'-CACACGGTCATCAGCACTGAAC-3'	124	ORIGENE	1,98
	PGK1 (5230)	5'-CCGCTTTCATGTGGAGGAAGAAG-3' 5'-CTCTGTGAGCAGTGCCAAAAGC-3'	149	ORIGENE	1,9
	PGK2 (5232)	5'-TGACGAGAACGCTCAGGTTGGA-3' 5'-GCCTTGCTTGAGCCACAACCTG-3'	122	ORIGENE	1,82
	ENO1 (2023)	5'-ATGGTGTCTCATCGTTCGGG-3' 5'-CCAGTCTTGATCTGCCAGTG-3'	86	Design maison	1,96
	ENO2 (2026)	5'-CTGTATCGCCACATTGCTCAGC-3' 5'-AGCTTGTTGCCAGCATGAGAGC-3'	101	ORIGENE	1,7
	ENO3 (2027)	5'-TGGGAAGGATGCCACCAATGTG-3' 5'-GCGATAGAAGCTCAGATGCTGCC-3'	160	ORIGENE	1,79
	PKM1 (5315)	5'-CGAGCCTCAAGTCACTCCAC-3' 5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'	120	Golberg, al(118)18	et 1,95
	PKM2 (5315)	5'-ATTATTTGAGGAACTCCGCGCCT-3' 5'-ATTCCGGGTACAGCAATGATGG-3'	190	Golberg, al(118)18	et 1,87
	LDHA (3939)	5'-GATTCCAGTGTGCTGTATGG-3' 5'-TCAGTCCCTAAATCTGGGTGC-3'	80	Design maison	1,96
	LDHB (3945)	5'-GCGGAAGAAGAGGCAACAGT-3' 5'-ATCAGCCAGAGACTTCCAG-3'	105	Design maison	1,86
	SCL2A1 (6513)	5'-GTCTTCTATTACTCCACGAGCA-3' 5'-ACAAACAGCGACACGACAG-3'	113	Design maison	1,92
	SCL2A2 (6514)	5'-ATGTCAGTGGGACTTGTGCTGC-3' 5'-AACTCAGCCACCATGAACCAGG-3'	131	ORIGENE	1,94
	SCL2A3 (6515)	5'-TGCCTTTGGCACTCTCAACCAG-3' 5'-GCCATAGCTCTTCAGACCCAAG-3'	98	ORIGENE	1,89
	SCL2A 4 (6517)	5'-CCATCCTGATGACTGTGGCTCT-3' 5'-GCCACGATGAACCAAGGAATGG-3'	133	ORIGENE	1,85
	HIF1A (3091)	5'-CCCATTTTCTACTCAGGACACAG-3' 5'-GCTTGCGGAACTGCTTTCTA-3'	124	Design maison	1,93
	VDAC1 (7416)	5'-GCAAAAATCCCGAGTGACCCAGA-3' 5'-TCCAGGCAAGATTGACAGCGGT-3'	154	ORIGENE	1,93
Gènes de références	TBP (6908)	5'-CCACGAACCACGGCACTGATTT-3' 5'-CAGTCTGGACTGTTCTTCACTCTT-3'	78	Design maison	2,01
	OAZ1 (4946)	5'-GGATAAACCCAGCGCCAC-3' 5'-TACAGCAGTGGAGGGAGACC-3'	104	Design maison	1,85

Tableau 2. Liste des amorces utilisées pour évaluer l'expression des différents gènes étudiés. Sont reportés dans ce tableau leur origines, leur efficacité ainsi que la taille des transcrits générés par qPCR. Pour note, HK4 n'étant pas exprimé dans les cellules utilisées au cours des expérimentations, cette isoforme n'a pas été analysé.

3.7. PCR quantitative après transcription inverse (RTq-PCR)

Les RTq-PCR ont été menées conformément aux recommandations du MIQE (acronyme pour l'anglais, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (119).

Les ARN cellulaires totaux ont été extraits en utilisant le kit AllPrep RNA/Protein (qiagen) selon les instructions du fabricant.

La reverse transcription a été réalisée en utilisant le kit High-Capacity RNA-to-DNA (Life Technologies) selon les instructions du fabricant.

A l'aide de l'automate StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied BioSystems), 40 cycles de PCR ont été réalisés suivis d'une étape de courbe de fusion avec 5 µl de produit de RT, 10 µl du mix SYBR green du kit FastStart Universal Sybr Green ROX (Roche) en présence de 4 pmoles d'amorces sens et antisens spécifiques des gènes décrits en amont.

Les gènes de référence ont été validés conformément à l'application BestKeeper (120). Le gène TBP (TATA-box Binding Protein) a été retenu pour la normalisation des échantillons provenant des cellules RPTE infectées ou non par le virus BK. Le gène OAZ1 (Ornithine Decarboxylase AntiZyme 1) a été retenu pour la normalisation des échantillons provenant des A549 infectées ou non par la souche PR8.

3.8. Dosage de l'activité l'HK

L'extraction et le dosage de l'activité l'HK ont été réalisées selon une méthode modifiée de celle décrite par Monakhov et al (121). Les cellules décongelées ont été lysées à la seringue pourvue d'un filtre de 0,22 µm dans du tampon d'homogénéisation pré-refroidi (20 mg/ 200 µl, en poids / volume) contenant 0,05 M de Tris-HCl, 0,25 M de saccharose, 0,005 M EDTA (pH 7,4), et 0,005 M de 2-mercaptoéthanol. Les homogénats ont été centrifugés à 13000 g pendant 10 min à 4°C. L'activité de l'HK a été mesurée sur les surnageants selon le principe suivant : le glucose, substrat de la réaction est phosphorylé par l'HK à doser en présence d'ATP en G-6-P, lui-même oxydé par la G6PDH en présence de NAD alors réduit en NADPH dont l'absorbance est mesurée à 340 nm.

Pour ce faire, la réaction a été démarrée en mettant en contact les surnageants maintenus à 4°C avec le mix réactionnel pré-chauffé à 37°C, composé de tampon de

triéthanolamine (pH 7,6) à une concentration de 0,05 M, de D-glucose à 0,555 M, de MgCl₂ à 0,1 M, de NADP à 0,014 M, et enfin de G6PDH à 125 U/ml (*Saccharomyces cerevisiae*). Un contrôle sans glucose a été réalisé de manière à soustraire le biais engendré par le NADPH endogène potentiellement présent dans les homogénats. L'absorbance a été enregistrée en continu pendant 60 min à 340 nm (lecteur de plaque infinie M200; Tecan). Une solution standard d'HK (Sigma-Aldrich) a été utilisée comme témoin positif.

Chaque échantillon a été dosé en duplicat et les résultats ont été exprimés en nmol de glucose consommée par min et par cellule.

3.9. Analyses statistiques

Pour chaque modèle d'infection, la consommation ou la production des métabolites, l'expression des gènes et l'activité de l'HK ont été comparées entre les cellules infectées et les cellules non infectées comme témoin négatif. Les résultats seront représentés dans la prochaine partie, sous la forme moyenne +/- écarts types.

Les expériences ont été répétées au moins deux fois et à chaque fois sous la forme au minimum de triplicats biologiques et pour chaque échantillon biologique de duplicats analytiques.

La comparaison des résultats entre deux groupes a été analysée avec le test t de Student. Les différences dont la p-value est inférieure à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

4. RESULTATS

Il est important de noter l'absence de différence significative de viabilité des cellules au moment des récoltes qu'il y ait infection ou non. Aussi, les analyses métaboliques ont pu être menées en s'affranchissant du biais lié à la mortalité.

D'autre part, il faut préciser qu'il n'y a pas eu de restriction en apport de glucose tout au long des cultures. En effet, la plus basse concentration à la fin des récoltes représente 35% de la concentration initiale en glucose. Par ailleurs le lactate qui peut être responsable de la mort cellulaire (122) n'a jamais atteint la limite toxique de 20 mM (122) dans le surnageant des cultures.

4.1. Influence de l'infection par le virus BK sur la glycolyse

4.1.1. L'infection par le virus BK active la glycolyse aérobie

L'infection des cultures cellulaires par le BK virus a été monitorée par IFI permettant la détection des antigènes viraux AgT et VP1, principal antigène capsidiale. Dans nos conditions d'infection et selon l'anticorps utilisé, l'IFI a montré à J3 post infection au moins 50% de cellules infectées (Figure 13). Ceci a été confirmé par deux expérimentations indépendantes.

Le glucose des surnageants des cultures a été dosé et normalisé par le nombre de cellules vivantes à J2, J3 et J5 post infection.

De manière intéressante, on observe une augmentation significative de la consommation en glucose d'un facteur 2,7 dans les cellules infectées à J5 post infection. Concomitamment, on constate une augmentation significative de la production de lactate d'un facteur 2,5 dans les cellules infectées (Figure 12).

Ainsi l'augmentation de la consommation de glucose couplée à l'augmentation de la production de lactate témoigne de l'augmentation du flux glycolytique à travers la glycolyse aérobie.

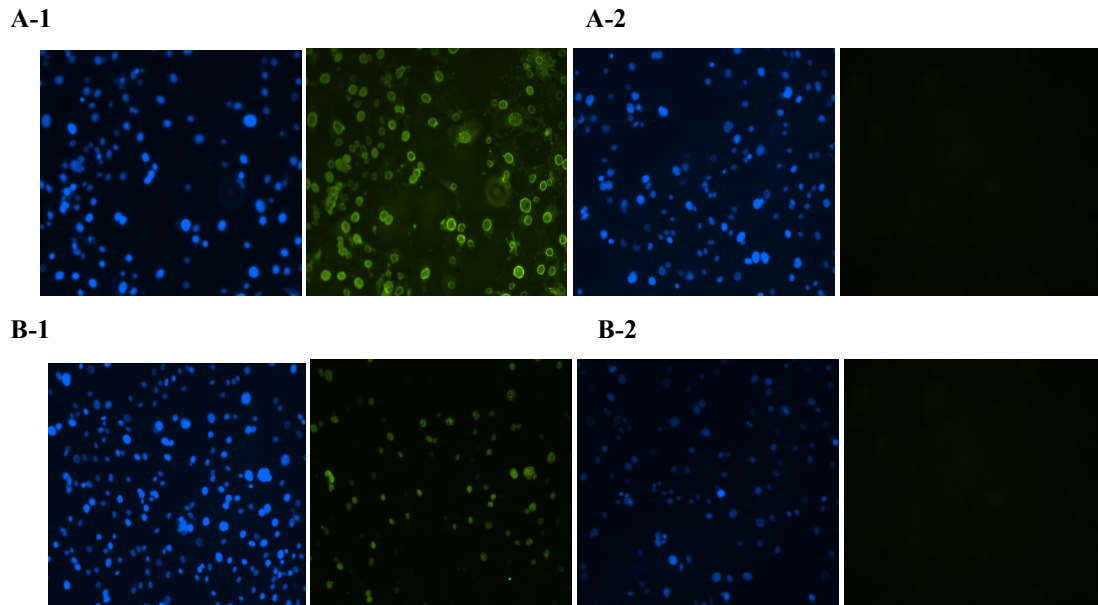
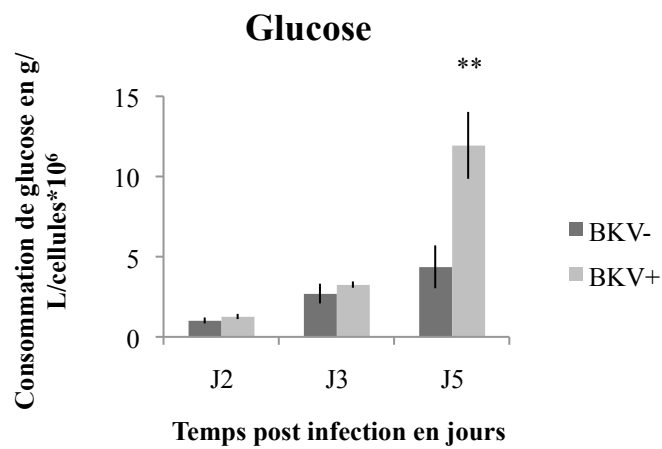


Figure 12. Immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur les cellules RPTe à J3 post infection par le virus BK. En A-1, photographies de l'IFI des cellules infectées réalisée à l'aide de l'anticorps primaire anti-VP1 marqué en vert (Alexa 488) et sa contre coloration en bleu (Hoechst). En A-2, le contrôle négatif (cellules non infectées). En B-1, photographies de l'IFI des cellules infectées réalisée à l'aide de l'anticorps primaire anti-AgT marqué en vert (Alexa 488) et la contre coloration en bleu (Hoechst). En B-2, le contrôle négatif (cellules non infectées).

A



B

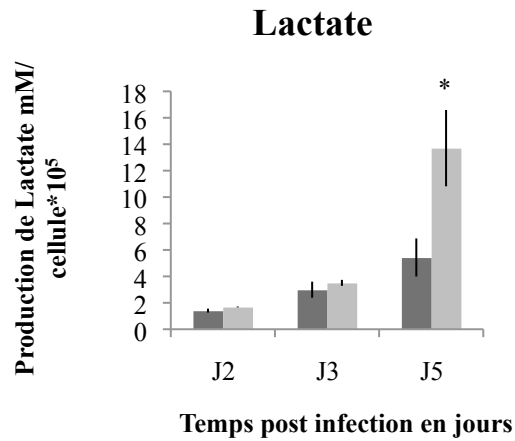


Figure 13. Effet de l'infection des cellules RPTE par le virus BK sur la consommation de glucose et la production de lactate à J2, J3 et J5 post infection. L'infection par le virus BK modifie la consommation de glucose en A et la sécrétion de lactate en B dans les cellules RPTE. Les concentrations en métabolites ont été normalisées par le nombre de cellules vivantes. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). *, p<0,05, **, p<0,01, entre les cellules infectées (BKV+) et non infectées (BKV-), (test de Student).

4.1.2. L'effet de l'infection du virus BK sur la glycolyse ne résulte pas de la modulation de l'expression des gènes étudiés impliqués dans la glycolyse

A J3 et J5 post infection, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation d'expression des gènes étudiés. A l'inverse et de manière surprenante, à J3 post infection, on peut noter une faible diminution tout de même significative pour les gènes SLC2A2, SLC2A3, PGK1 et HIF1 α . Leur expression représente environ 60% de celle évaluée dans les cellules non infectées (Figure 14A et 14B). Pour ces mêmes gènes, la diminution s'accroît à J5, descendant jusqu'à 30% d'expression pour le gène HIF1 α . De plus, à J5, trois gènes supplémentaires apparaissent comme étant réprimés : G6PD, ALDOC et PKM1 (Figure 15A et 15B).

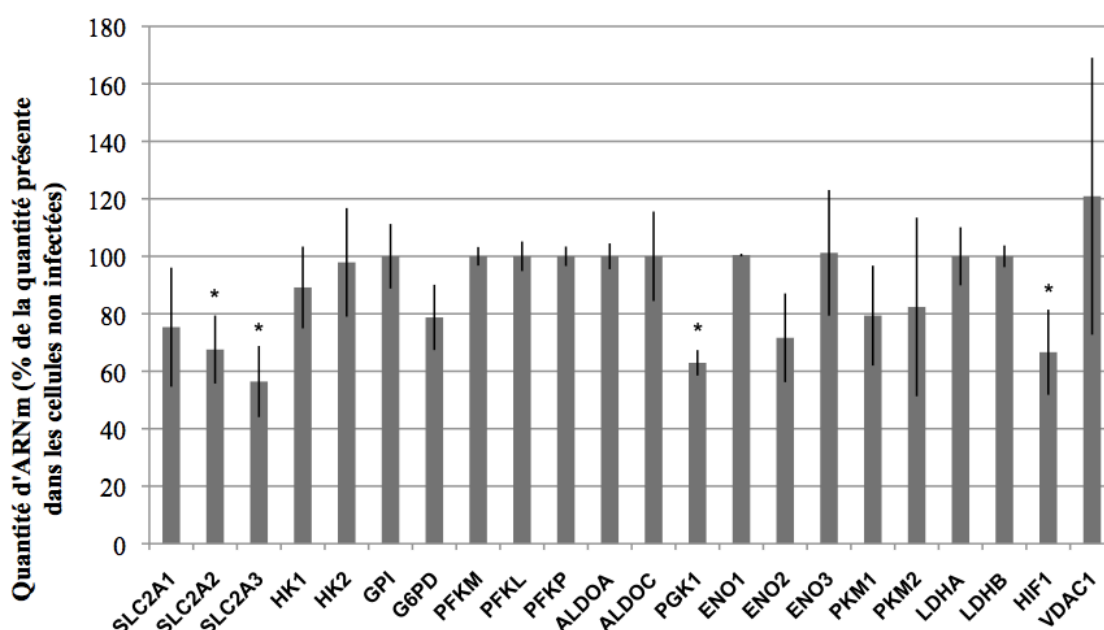


Figure 14A. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTe, à J3 post infection. Le niveau des différents transcrits a été quantifié par RT-qPCR comme décrit dans la partie matériels et méthodes. Le niveau d'expression de chaque gène est exprimé en pourcentage de celui atteint dans les cellules non infectées. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). *, p<0,05, entre les cellules infectées et non infectées (test de Student).

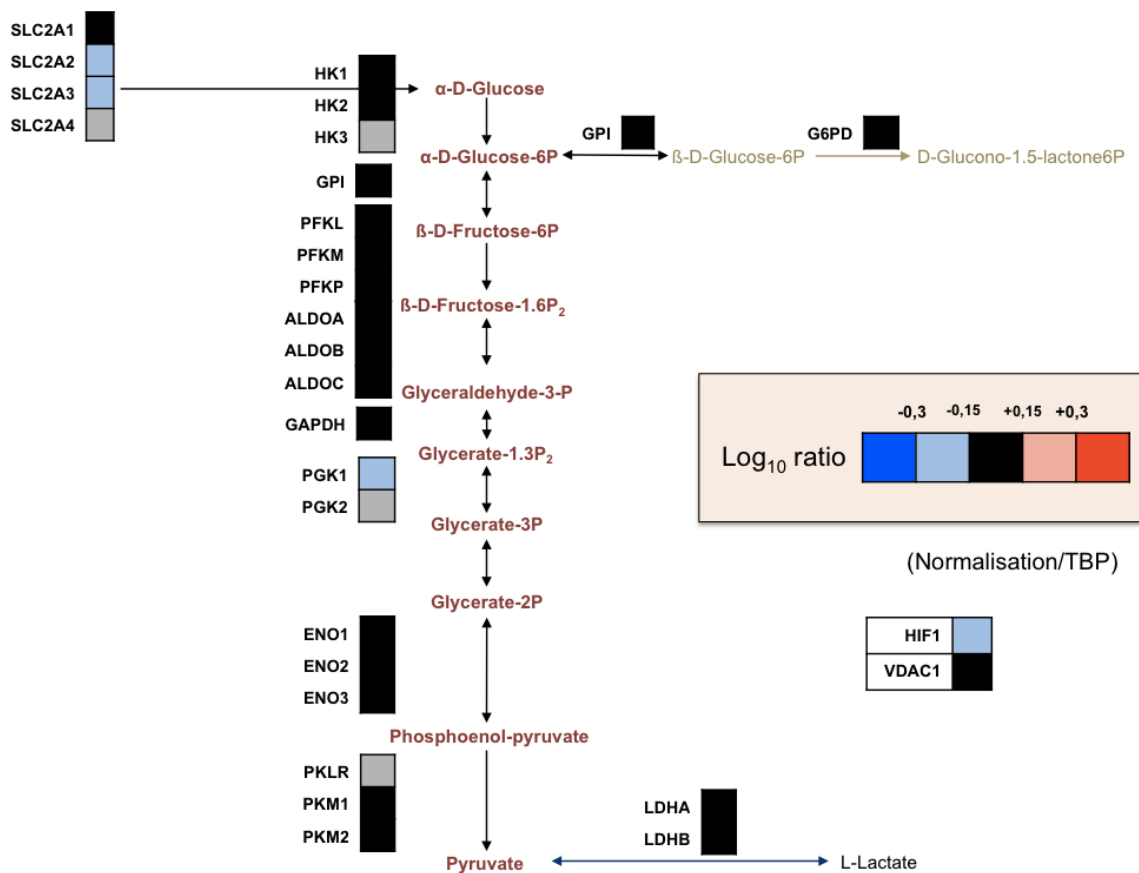


Figure 14B. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J3 post infection. Autre représentation plaçant les enzymes étudiés en regard de la voie de la glycolyse. L'expression des gènes correspondant est exprimée en log₁₀ du rapport de la quantité de transcrit présent dans les cellules infectées sur la quantité de transcrit présent dans les cellules non infectées. Une échelle de couleur permet d'apprécier l'abondance relative des transcrits. Les carrés noirs indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. Les carrés gris indiquent que les gènes ne sont pas exprimés, que les cellules soient infectées ou non.

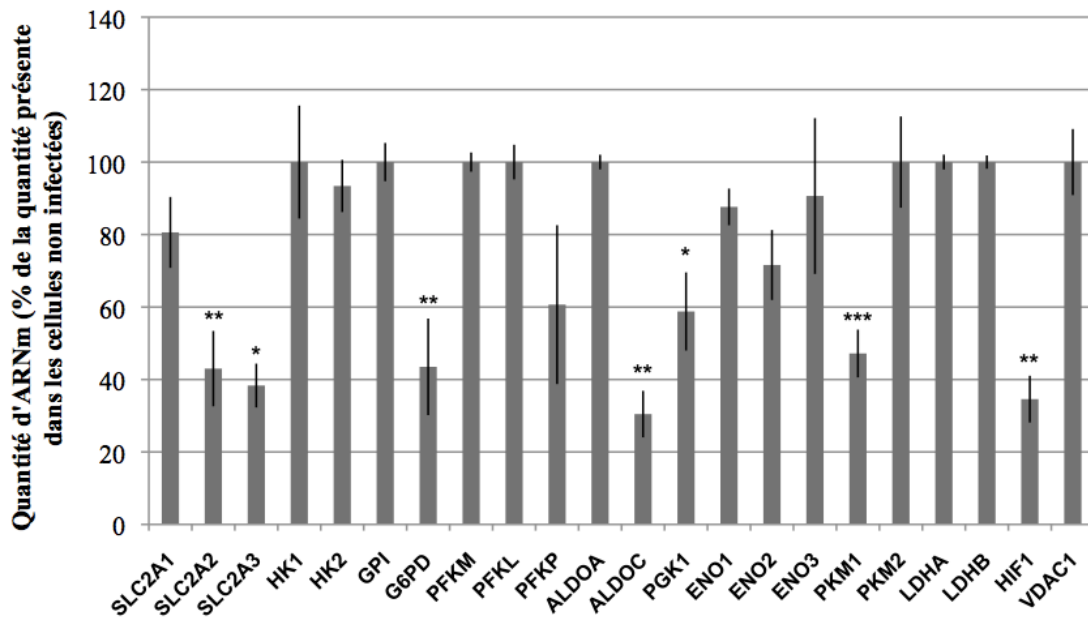


Figure 15A. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTe, à J5 post infection. Le niveau des différents transcrits a été quantifié par RT-qPCR comme décrit dans la partie matériel et méthode. Le niveau d'expression de chaque gène est exprimé en pourcentage de celui atteint dans les cellules non infectées. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). *, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 entre les cellules infectées et non infectées (test de Student).

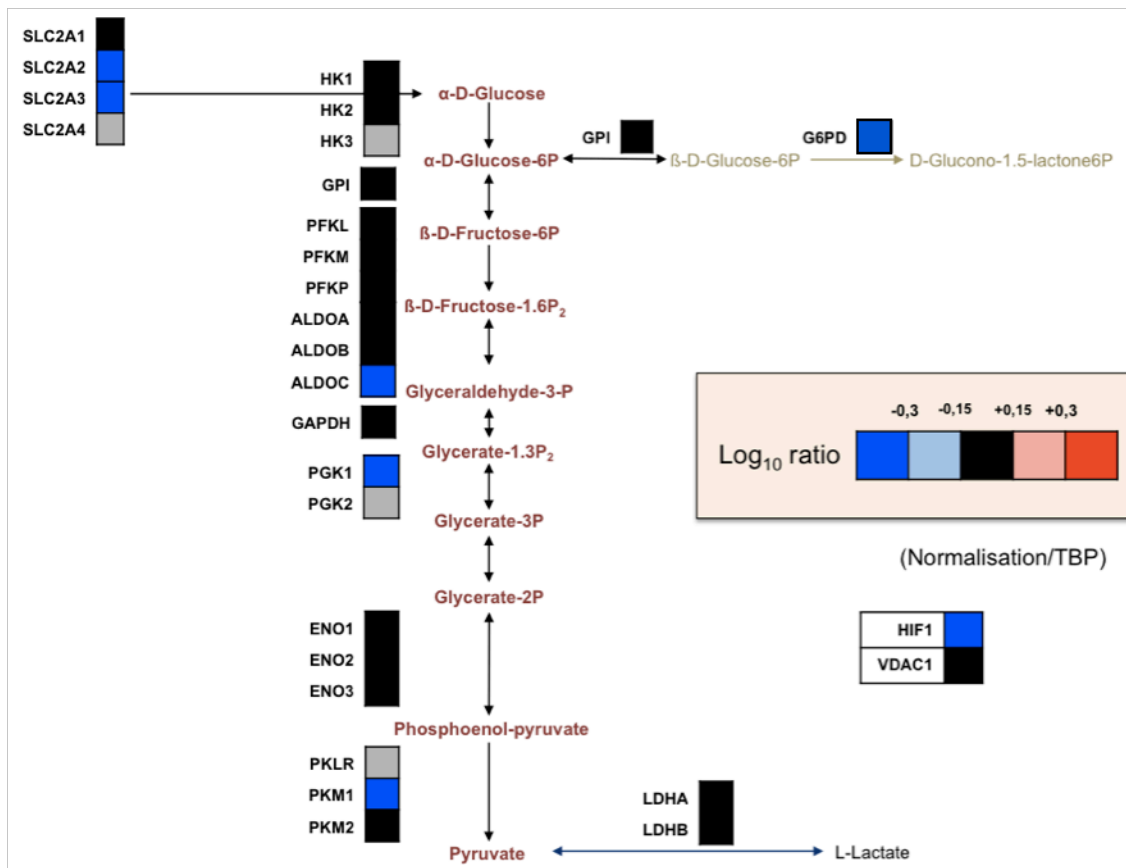


Figure 15B. Effet de l'infection par le virus BK sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules RPTE, à J5 post infection. Autre représentation plaçant les enzymes étudiés en regard de la voie de glycolyse. L'expression des gènes correspondant est exprimée en log₁₀ du rapport de la quantité de transcrit présent dans les cellules infectées sur la quantité de transcrit présent dans les cellules non infectées. Une échelle de couleur permet d'apprécier l'abondance relative des transcrits. Les carrés noirs indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. Les carrés gris indiquent que les gènes ne sont pas exprimés que les cellules soient infectées ou non.

4.1.3. L'infection par le virus BK augmente l'activité apparente de l'HK

Ayant constaté une augmentation significative de la glycolyse à J5 post infection et une absence de régulation au niveau transcriptionnel, il est probable que l'augmentation de la glycolyse soit le résultat de modulations post-traductionnelles des enzymes de la glycolyse et plus particulièrement des enzymes limitantes. Comme dit précédemment, l'HK est la première enzyme limitante de la glycolyse. De plus, elle est impliquée par son isoforme HK2 dans le shift métabolique observé lors de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses (23). Par ailleurs, l'augmentation de son activité par modulation allostérique par la protéine NS5A du VHC (14) a été montrée par notre équipe. Nous avons donc dosé à J5 post infection l'activité apparente de l'HK dans les lysats cellulaires comme précédemment décrit dans la section matériels et méthodes. Les résultats obtenus ont été normalisés par le nombre de cellules vivantes. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une augmentation significative d'environ 30% de l'activité de l'HK dans les cellules infectées par le virus BK (Figure 16).

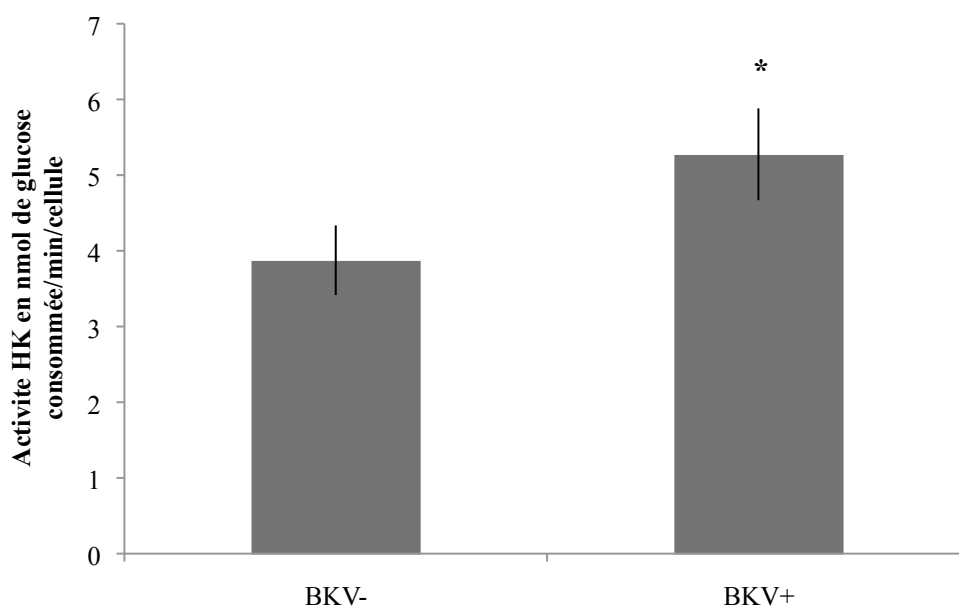


Figure 16. Modulation de l'activité de l'HK dans les cellules RPTE infectée par le virus BK à J5 post infection. Après extraction de l'enzyme, l'activité de l'HK a été mesurée comme précédemment décrit dans la section matériels et méthodes, et normalisée par le nombre de cellules vivantes. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). *, $p < 0,05$, entre les cellules infectées (BKV+) et non infectées (BKV-), (test de Student).

4.2. Influence de l'infection par le virus influenza de type A sur la glycolyse

4.2.1. L'infection par le virus influenza de type A n'active pas la glycolyse

Le glucose des surnageants des cultures a été dosé et normalisé par le nombre de cellules vivantes à 20 heures post infection. L'infection des cultures cellulaires par le virus influenza de type A a été monitorée par IFI permettant la détection de l'antigène viral NP. Dans nos conditions d'infection, l'IFI a montré un taux d'infection de 90% (Figure 17). Ceci a été confirmé par deux expérimentations indépendantes.

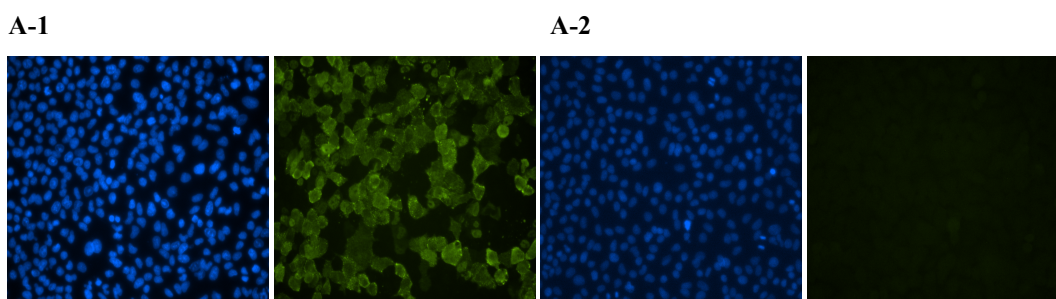
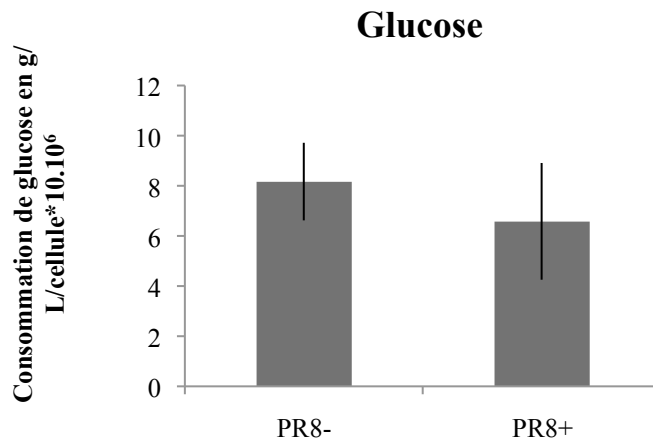


Figure 17. Immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur les cellules A549 à 20H post infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34. En A-1, photographies de l'IFI des cellules infectées réalisée à l'aide de l'anticorps primaire anti-NP marqué en vert (Alexa 488) et sa contre coloration en bleu (Hoechst). En A-2, le contrôle négatif (cellules non infectées).

De manière étonnante, la concentration en glucose ne diffère pas significativement dans les surnageants des cellules infectées ou non infectées. En revanche, une diminution, modeste (de 12%) mais statistiquement significative de la production de lactate a été observée dans les surnageants des cellules infectées (Figure 18). Ces deux résultats permettent d'avancer que le virus influenza de type A n'active pas la glycolyse aérobie dans nos conditions expérimentales.

A



B

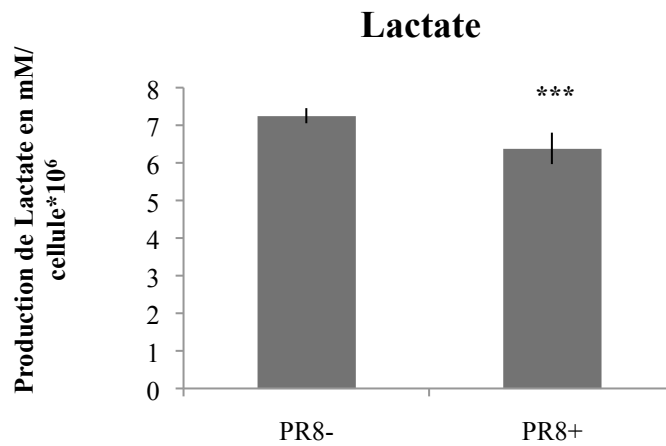


Figure 18. Effet de l'infection des cellules A549 par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 sur la consommation de glucose et la production de lactate à 20H post infection
L'infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34 ne modifie pas la consommation de glucose en A mais diminue la sécrétion de lactate en B dans les cellules A549. Les concentrations en métabolites ont été normalisées par le nombre de cellules vivantes. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=7). ***, $p < 0,001$, entre les cellules infectées (PR8+) et non infectées (PR8-) (test de Student).

4.2.2. L'infection par le virus influenza de type A engendre d'importantes modifications transcriptionnelles des gènes impliqués dans la glycolyse

A 20H post infection par la souche PR8, nous avons constaté une diminution significative de l'expression de la majorité des gènes étudiés. Seulement 3 gènes ont une expression qui demeure stable malgré l'infection : ALDOC, ENO3 et HIF1 α . Par ailleurs et de manière surprenante, alors que la consommation de glucose est inchangée et que la majorité des gènes sont réprimés, les gènes codant pour HK2 et HK3 se démarquent de manière flagrante avec une franche augmentation relative de leur expression, respectivement d'un facteur 3 et 6. Parallèlement, il convient de noter que l'expression du gène codant pour HK1 est diminuée de plus de moitié (Figure 19).

Ainsi, alors qu'aucune différence significative de consommation de glucose n'a été mise en évidence lors de l'infection, des modulations transcriptionnelles des principaux acteurs de la glycolyse sont observées. Il y a effectivement un maintien de la consommation de glucose malgré l'effondrement de l'expression de la majorité des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse.

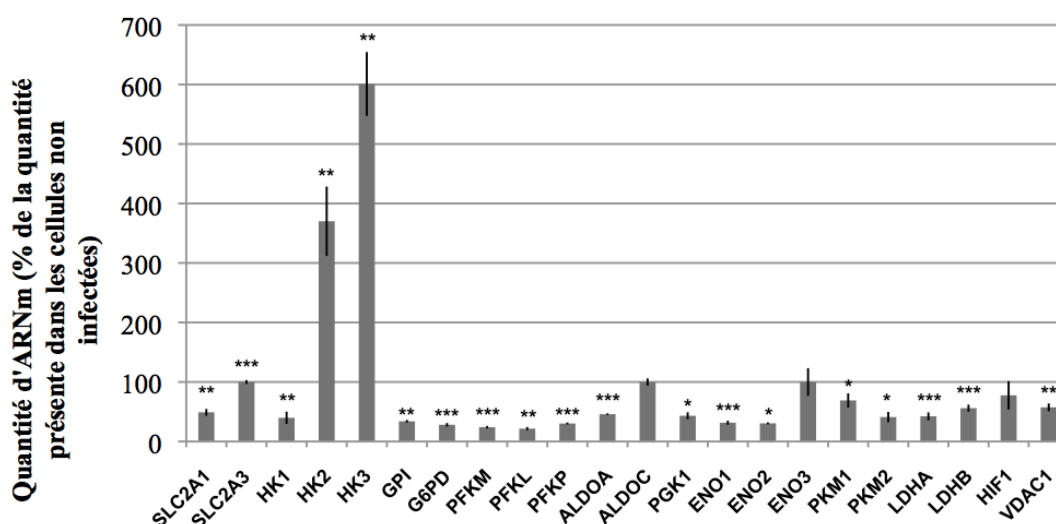


Figure 19A. Effet de l'infection par le virus influenza sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules A549, 20H post infection. Le niveau d'expression de chaque gène est exprimé en pourcentage de celui atteint dans les cellules non infectées. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). *, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001, entre les cellules infectées et non infectées (test de Student).

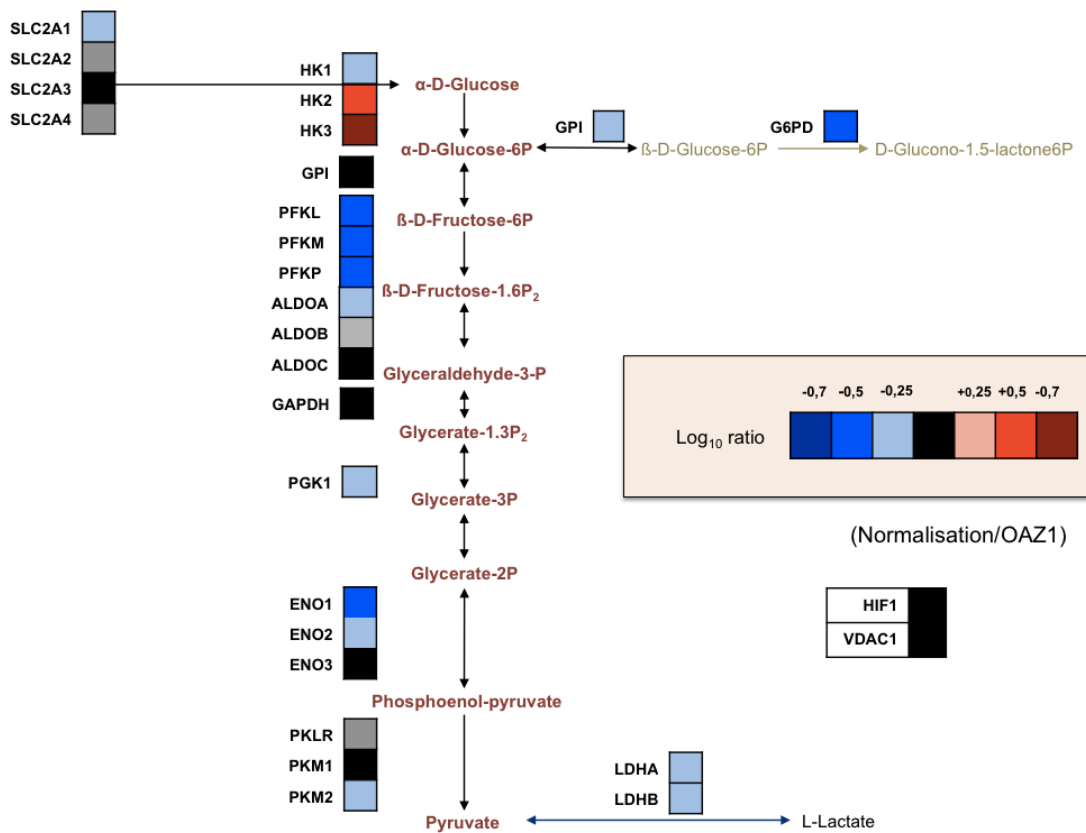


Figure 19B. Effet de l'infection par le virus influenza sur l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse dans les cellules A549, 20H post infection. Autre représentation plaçant les enzymes étudiés en regard de la glycolyse. L'expression des gènes correspondant est exprimée en log₁₀ du rapport de la quantité de transcrit présent dans les cellules infectées sur la quantité de transcrit présent dans les cellules non infectées. Une échelle de couleur permet d'apprécier l'abondance relative des transcrits. Les carrés noirs indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. Les carrés gris indiquent que les gènes ne sont pas exprimés que les cellules soient infectées ou non.

4.2.3. L'infection par le virus influenza de type A n'augmente pas l'activité de l'HK

De manière similaire à l'étude menée sur les virus BK, nous avons dosé à 20H post infection par la souche PR8, l'activité apparente de l'HK dans les lysats cellulaires comme précédemment décrit dans la section matériels et méthodes. Les résultats ont été normalisés par le nombre de cellules vivantes. En accord avec l'absence de variation significative de la consommation de glucose, nous n'avons pas observé de différence significative de l'activité HK globale entre les cellules infectées et les cellules non infectées (Figure 20).

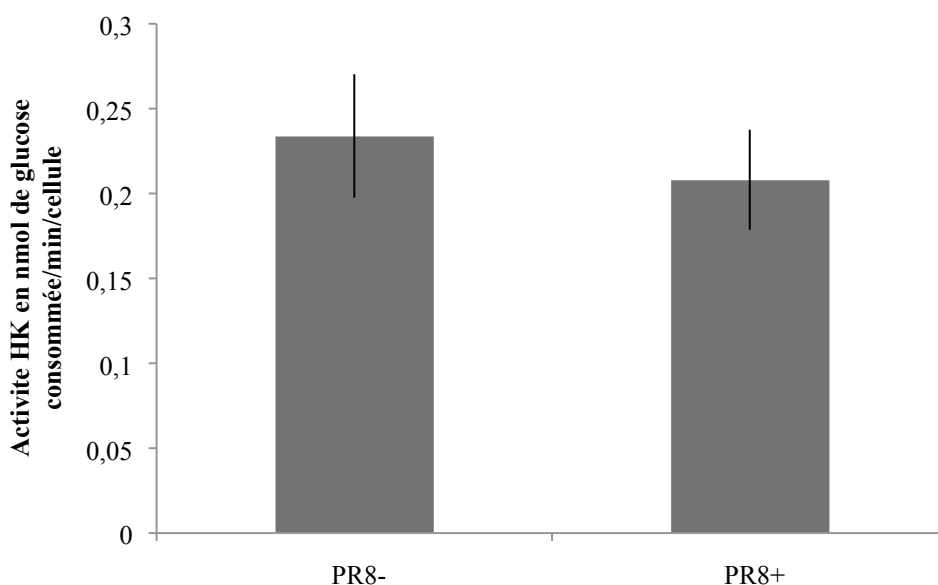


Figure 20. Modulation de l'activité de l'HK dans les cellules A549 à 20H post infection par la souche A/H1N1/Puerto Rico/8/34. Après extraction de l'enzyme, l'activité de l'HK a été mesurée comme précédemment décrit dans la section matériels et méthodes, et normalisée par le nombre de cellules vivantes. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3). PR8-, cellules non infectées ; PR8+, cellules infectées.

5. DISCUSSION

- *Le virus BK*

L'infection par le virus BK engendre un effet Warburg-like avec augmentation significative de la consommation de glucose et de la production de lactate à J5 post infection.

Au niveau transcriptionnel, les variations d'expression des gènes étudiés sont faibles. Ceci laisse penser que la modulation de la glycolyse s'effectue à un autre niveau de régulation que celui de l'expression des gènes. Cependant, bien que de faible amplitude, il est étonnant de constater, à J3 et J5 post infection, la baisse significative de l'expression des gènes SLC2A2, SLC2A3, HIF1 α et PGK1 à laquelle s'ajoute la répression tardive de G6PD, d'ALDOC et de PKM1.

Concernant les transporteurs du glucose, l'expression de SLC2A1 codant pour GLUT1 n'est pas modifiée, en revanche de manière surprenante, parallèlement à l'augmentation de la consommation de glucose, l'expression de SLC2A2 et SLC2A3, codant respectivement pour GLUT2 et GLUT3, est significativement diminuée. GLUT2 est un transporteur de faible affinité pour le glucose avec un Km de l'ordre de 17 mM, de ce fait il ne fonctionne qu'en présence de fortes concentrations de glucose en milieu extracellulaire. D'autre part, il est aussi bidirectionnel permettant la libération du G-6-P lors de la gluconéogenèse (123). La baisse d'expression de ce gène irait dans le sens d'une diminution de libération du G-6-P alors pleinement disponible pour la suite de la glycolyse. GLUT1 et GLUT3 ont une grande affinité pour le glucose de l'ordre de 1mM et sont impliqués dans le transport basal du glucose. Néanmoins, l'interprétation de la variation d'expression des gènes codant pour ces transporteurs doit être faite avec prudence. En effet, il est nécessaire d'étudier l'expression de ces transporteurs à la surface des cellules dans la mesure où leur transcription peut être abaissée sans impact sur leur expression au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, des expériences en cytométrie de flux sont nécessaires pour compléter ces observations transcriptionnelles. De plus, le flux de glucose à travers la membrane dépend du degré de saturation des transporteurs. Il se peut que la saturation de ces transporteurs ne soit pas du tout atteinte et que la modification de leur quantité n'ait pas d'incidence sur l'entrée de glucose dans la cellule. Aussi, des études complémentaires à l'aide de deoxy-D-glucose marqué, pouvant être

absorbé mais non métabolisé par la cellule, permettraient d'évaluer précisément le flux de glucose membranaire par dosage de la radioactivité intracellulaire.

Concernant HIF1 α , il s'agit d'un facteur de transcription augmentant notamment l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse. Si sa régulation au niveau protéique est bien documentée, cela n'est pas le cas au niveau transcriptionnel. Néanmoins, une étude a montré sur des cellules endothéliales dans des conditions d'hypoxie maintenue, une diminution progressive du transcrit de HIF1 α alors que la protéine associée est stabilisée et augmente rapidement pour finalement décroître à des temps tardifs (124). Ainsi la baisse de la quantité de transcrit ne signifie pas que l'expression de la protéine diminue. Dans cette optique, des analyses transcriptionnelles en des temps plus précoces ainsi que des études supplémentaires en western blot sont à envisager pour suivre la cinétique de HIF1 α .

Concernant les résultats obtenus quant à l'expression des gènes codant pour les différentes isoformes de la pyruvate kinase, il est intéressant de noter que l'isoforme M2 de la pyruvate kinase est prédominante dans la plupart des cellules cancéreuses dans lesquelles est observé l'effet Warburg. Cette isoforme, particulièrement sous sa forme dimérisée, a une activité plus faible que l'isoforme M1, et contribuerait à l'accumulation de métabolites intermédiaires en amont, précurseurs de voies anaboliques (125,126). Par ailleurs, sous sa forme dimérique, PKM2 peut être importée dans le noyau, pouvant jouer le rôle de coactivateur transcriptionnel (127). Dans notre étude, la répression touche uniquement le gène codant pour l'isoforme M1 de la pyruvate kinase et non l'isoforme M2, ceci accroît la prédominance du transcrit de l'isoforme M2, déjà majoritaire dans les cellules non infectées. De plus, il a été décrit plusieurs interactions entre PKM2 et des protéines virales. Ainsi il a été montré que E7 de HPV de type 16 et pp60v-src du virus du sarcome de Rous (RSV), régulent l'enzyme de manière allostérique et privilégient sa forme dimérique (128). Par ailleurs, la protéine NS5B du VHC interagit avec PKM2, et la répression de l'enzyme inhibe la réplication du virus (129). Ainsi, PKM2 pourrait constituer une cible de régulation potentielle tant sur le plan transcriptionnel que post-traductionnel au cours de l'infection par le virus BK.

Néanmoins, dans tous les cas, des études quantitatives en western blot et fonctionnelles par dosage de l'activité enzymatique couplé à des dosages de métabolites intermédiaires sont à réaliser pour compléter et interpréter de manière rigoureuse la baisse significative de ces transcrits.

Au niveau protéique, l'activité HK est significativement augmentée dans les cellules RPTE infectées par le virus BK. Or la régulation ne se fait pas au niveau transcriptionnel, en témoigne l'absence de variation significative de l'expression des gènes codant pour les différentes isoformes de HK. Ainsi, ces résultats incitent à avancer d'emblée deux hypothèses : la première, d'ordre quantitatif, est l'augmentation de la traduction ou la stabilisation de la protéine, la deuxième, d'ordre qualitatif, est une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme par conversion covalente post traductionnelle (protéolyse, phosphorylation) ou modulation allostérique par une protéine virale comme il a été décrit précédemment pour le VHC (14). Des expériences menées en western blot sont donc à envisager de manière à apprécier les variations d'ordre quantitatif. D'autre part, pour répondre à la question de l'éventuelle modulation de l'activité intrinsèque de l'enzyme, les paramètres cinétiques à savoir la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) doivent être déterminés en dosant par exemple l'activité d'une quantité d'HK purifiée constante en présence de lysat de cellules infectées ou non et pour différentes concentrations de glucose.

Néanmoins, d'autres paramètres peuvent également moduler l'activité de l'HK, en particulier sa localisation intracellulaire. En effet, comme précédemment décrit, HK1 et HK2 sont capables de se lier à la membrane externe de la mitochondrie, cette localisation permet une phosphorylation du glucose privilégiée par l'utilisation directe de l'ATP mitochondriale et donc une activité optimisée (26). De plus, cette optimisation serait accentuée pour la forme mitochondriale de HK2 dans la mesure où elle serait moins sensible au rétrocontrôle négatif du G-6-P (23). Ainsi, il est très important de noter que l'activité HK globale dépend également de la localisation intracellulaire des différentes isoformes. De ce fait, des études supplémentaires en immunofluorescence indirecte par triple marquage des 3 isoformes exprimées dans les cellules RPTE permettraient de les localiser et compléter de manière rigoureuse l'analyse de l'activité HK globale.

- *Le virus influenza de type A*

Il est intéressant de noter des résultats très différents pour le deuxième modèle viral étudié. Il a été montré précédemment que des inhibiteurs de la glycolyse inhibaient la réplication du virus, soulignant sa dépendance vis-à-vis de cette voie métabolique (31). Néanmoins nos résultats indiquent que le virus ne stimule pas la glycolyse, en témoigne l'absence d'augmentation de la consommation de glucose dans les cellules infectées. De

plus et de manière surprenante, l'infection engendre une diminution significative de la production de lactate comme déjà constaté dans des analyses métaboliques menées sur cellules humaines embryonnaires de rein (HEK293) infectées par la souche PR8 à une MOI de 0,001 (109) ainsi que sur des cellules MDCK infectées par une souche de sous-type H3N8 à des MOI de 0,0001 à 1 (107). Néanmoins d'autres études du même groupe, réalisées avec des cellules MDCK infectées par la souche PR8 à des MOI allant jusqu'à 10, soit dans des bioréacteurs (108) soit en P6 (106), ont démontré une nette augmentation de l'activité de la voie glycolytique 12H post infection. Cependant, selon les auteurs, en raison des fortes MOI utilisées, ces changements métaboliques incomberaient davantage à l'apoptose qu'à la réplication elle-même (106). Or dans notre étude, ce biais a été contourné en choisissant une MOI et un délai de récolte de manière à réduire le plus possible le phénomène apoptotique tout en assurant l'infection de la majorité des cellules, en témoignent les numérations cellulaires couplées au test de viabilité ainsi que les résultats d'immunofluorescence indirecte. Les modifications observées semblent donc propres à l'infection elle-même. Ainsi, ce modèle viral d'infection aiguë n'engendrerait pas d'effet Warburg.

Une autre stratégie répliquative à évoquer est celle de l'autophagie (130). L'autophagie permet entre autre de recycler les éléments cellulaires et est donc une autre source possible de biomasse. Or, le virus de la grippe active l'autophagie qui lui est nécessaire pour se répliquer (131). De plus dans des modèles de cellules cancéreuses, il est observé que le phénomène d'autophagie diminue l'effet Warburg, ce qui se traduit notamment par une baisse de la sécrétion de lactate (132). Tenant compte de ces informations, nos résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une dépendance du virus influenza de type A vis-à-vis de l'autophagie au détriment de l'effet Warburg.

Au niveau transcriptionnel, l'expression de la forte majorité des gènes analysés est clairement diminuée lors de l'infection, notamment l'expression des gènes codant pour les isoformes A et B de la lactate déshydrogénase (LDHA et LDHB). Ceci pourrait en partie expliquer la diminution significative de la production de lactate lors de l'infection. Le dosage de l'activité de l'enzyme serait cependant nécessaire pour confirmer cette hypothèse. D'autre part, de manière plus générale, il est important de constater que cette tendance globale de diminution quantitative des ARNm cellulaires n'est pas surprenante dans ce modèle viral. En effet, comme décrit dans l'introduction, la réplication du virus de la grippe repose sur le phénomène appelé le « cap snatching » (littéralement, vol de coiffe).

Pour rappel, le complexe de l'ARN polymérase virale clive l'extrémité 5' des pré-ARNm cellulaires correspondant à la coiffe. Ce fragment est alors utilisé comme amorces pour la synthèse des ARNm viraux (133). Les pré-ARNm cellulaires ainsi dépourvus de leur coiffe, sont instables et donc en quantité moindre, ce qui aboutit à une inhibition globale de l'expression des gènes de l'hôte (88). Nos résultats sont bien cohérents avec ces observations.

Néanmoins, de manière surprenante, deux gènes ne sont pas down régulés. En effet, l'expression du gène codant pour HK2 est multipliée par 3 et celle du gène codant pour HK3 est multipliée par 6 alors que celle du gène codant pour HK1 est divisée par 2,5. Il est intéressant dans un premier temps de noter que l'augmentation relative de l'expression de gène codant pour HK2 a aussi été montrée dans d'autres modèles viraux tels que le DENV (13) et l'adénovirus (8). D'autre part, d'un point de vue mécanistique et dans le modèle particulier de la grippe, ceci peut s'expliquer par le fait que HK2 et HK3 sont les deux gènes pour lesquels la quantité d'ARNm mesuré est la plus faible dans les cellules non infectées. Or, d'après Sikora et *al* (134), le « cap-snatching » cible les pré-ARNm cellulaires les plus abondants. Ainsi, de part leur faible quantité à l'état basal, les pré-ARNm de HK2 et HK3 seraient épargnés. Une autre hypothèse peut être une incompatibilité entre leur séquence en 5' constituant potentiellement les sites reconnus et clivés par le complexe de l'ARN polymérase virale. Toutefois, les séquences des extrémités 5' des pré-ARNm cellulaires mise à profit dans le « cap-snatching » semblent être très hétérogènes et sont encore mal définies (134).

Par ailleurs, cette différence transcriptionnelle a-t-elle un effet et un rôle dans la réplication virale ? Un autre point à discuter reste le fait que dans nos conditions expérimentales l'infection engendre une modulation de l'expression des différentes isoformes de l'HK tout en maintenant l'activité enzymatique globale. Si Janke et *al* avaient déjà constaté que l'activité HK restait inchangée malgré l'infection (135), notre étude apporte des données au niveau transcriptionnel. En effet, HK1 est l'isoforme exprimée de manière majoritaire dans les cellules A549 non infectées. La répression de son gène engendrée par l'infection et l'augmentation des transcrits des deux autres isoformes minoritaires semblent s'équilibrer et ne pas modifier l'activité HK globale. L'activité HK restant inchangée et la glycolyse modulée de manière négligeable, on peut se demander si le changement de proportion relative des transcrits des isoformes n'est pas impliqué dans un autre rôle que celui de la phosphorylation du glucose. En effet, comme brièvement abordé en introduction, il a été démontré que HK2 est non seulement impliquée dans la

glycolyse, mais aussi dans la survie cellulaire, notamment par son rôle dans la protection mitochondriale induite par Akt (136). De plus, la même équipe a montré plus récemment que HK2 dans des conditions de déplétion en glucose, activait l'autophagie par inhibition de TORC1, suggérant un lien entre la voie de la glycolyse et celle de l'autophagie (27) (Figure 21). Des expériences au niveau protéique doivent être menées pour voir si l'augmentation relative de l'expression de HK2 se traduit par une augmentation de sa protéine. Si telle est le cas les observations faites au niveau transcriptionnel seraient compatibles non seulement avec le phénomène d'autophagie en tant que stratégie répliquative mais aussi avec la fonction activatrice de HK2.

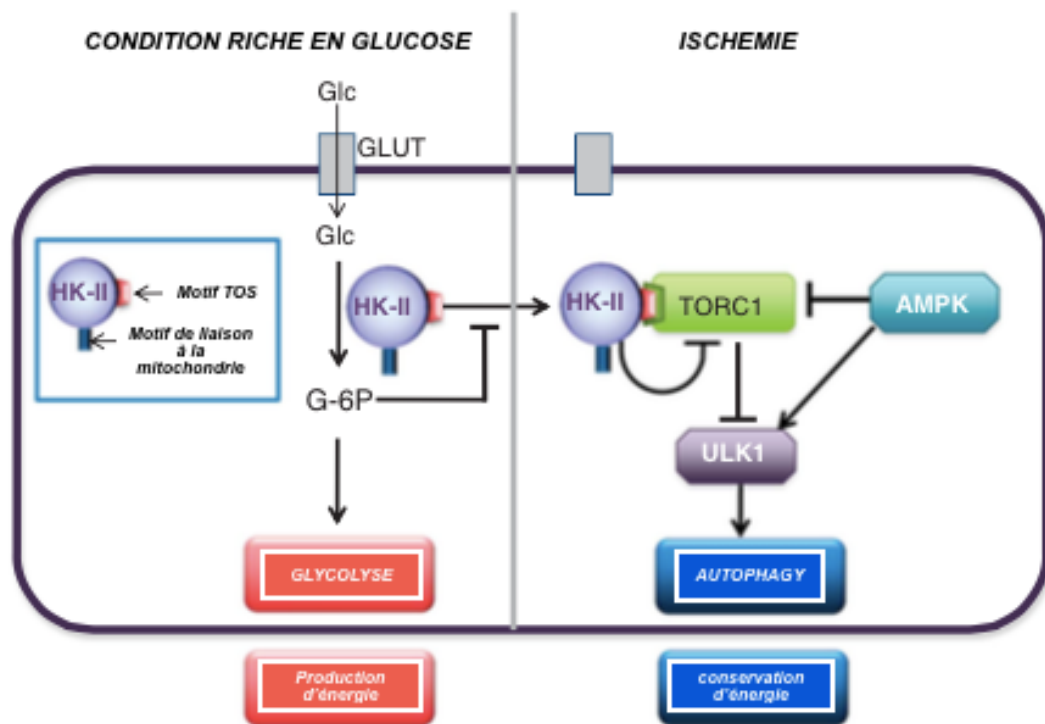


Figure 21. Représentation des rôles multiples de l'isoforme 2 de l'hexokinase (HK-II) : son rôle de phosphorylation du glucose (Glc) en glucose-6-phosphate (G-6P), sa capacité de liaison à la mitochondrie et au complexe TORC1 via son motif TOS. En inhibant TORC1, il a été montré que HK2 peut stimuler le phénomène d'autophagie en condition de déplétion en glucose.

Ainsi, ces travaux ont permis d'obtenir des données préliminaires sur la manière dont le virus BK et le virus influenza de type A modulent la glycolyse cellulaire. De manière intéressante, les effets ne sont pas les mêmes. L'hypothèse séduisante selon laquelle tous les virus engendreraient un effet Warburg-like pour assurer leur réplication ne semble donc pas pouvoir être généralisée. En effet, bien que le virus BK active la glycolyse aérobie et augmente l'activité HK, il semblerait que le virus influenza de type A adopte une toute autre stratégie répllicative. L'augmentation de l'expression du gène codant pour HK2 et la diminution significative de production de lactate engendrés par l'infection du virus influenza de type A sont deux résultats importants et apportent d'autres hypothèses de recherche sur les thèmes de métabolisme, autophagie et réplication. De plus, cela conforte le fait que l'HK a d'autres rôles que celui purement glycolytique et renforce son intérêt en tant que cible virale. Enfin, les différences constatées lors de cette étude incitent à étendre le screening de la voie glycolytique à d'autres modèles viraux pour tenter d'établir des paradigmes de modulation de la glycolyse en fonction des caractéristiques virales.

CONCLUSIONS

MEMOIRE SOUTENU PAR M^{elle} CAROLINE CHARRE

Il est connu depuis longtemps que certaines infections virales engendrent des perturbations du métabolisme de la cellule infectée. En particulier, la glycolyse est une voie métabolique majeure qui est modulée par un grand nombre de virus. En apport d'oxygène normal et dans une cellule saine et différenciée, la glycolyse permet d'aboutir à partir d'une molécule de glucose à une molécule de pyruvate, elle-même convertie en CO₂ dans la mitochondrie via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. La résultante énergétique de cette voie métabolique est de 36 molécules d'ATP. A l'inverse, en teneur en O₂ réduite, le pyruvate est préférentiellement réduit en lactate. Les réactions métaboliques mitochondriales sont très diminuées et l'apport énergétique est réduit à seulement 2 molécules d'ATP. De manière surprenante, alors que la teneur en O₂ reste normale, il est souvent observé que dans les cellules infectées, la majorité des molécules de glucose est directement convertie en lactate sans passer par la mitochondrie. Le rendement énergétique est donc fortement réduit. Pour compenser cette perte énergétique découlant du détournement de la mitochondrie vers la production de lactate, le flux glycolytique augmente permettant de générer une quantité d'énergie équivalente et de fournir par surcroît des composants élémentaires nécessaires à la production des nouveaux virions à savoir acides aminés, nucléotides, acides gras. Cette modulation métabolique est similaire à celle observée dans les cellules cancéreuses en prolifération et connue sous le nom d'effet Warburg.

Devant ces observations, se pose la question de l'universalité de cette modulation métabolique en tant que stratégie répliquative et celle de ses mécanismes intrinsèques. Autrement dit, existe-t-il des différences selon le type de famille virale et *a fortiori* selon le type d'infection et de cycle répliquatif.

Les travaux menés et décrits ici ont porté sur l'étude de la modulation de la glycolyse par deux virus jusqu'alors très peu étudiés sur le plan métabolique, le virus BK et le virus de

la grippe. Ces agents infectieux sont très différents aussi bien d'un point de vue structural que de leur pathogénicité. Aussi, nous avons sélectionné deux modèles opposant respectivement un virus à ADN engendrant des infections latentes et chroniques à un virus à ARN engendrant des infections aiguës et le plus souvent résolutive. D'autre part, pour tenter de déceler les mécanismes intrinsèques de modulation, plusieurs points de régulation métabolique potentiels ont été étudiés tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel.

Les infections virales ont été menées *in vitro*, en cultures cellulaires. Toutes les analyses de sortie ont été réalisées en comparaison avec les cultures cellulaires non infectées. Le glucose et le lactate qui sont les deux métabolites extrêmes de la glycolyse, ont été dosés dans le surnageant de cultures permettant ainsi d'apprécier l'effet Warburg-like engendré ou non par l'infection. Au niveau transcriptionnel, l'expression des gènes codant pour les principales enzymes impliquées dans la glycolyse a été quantifiée de manière relative. Enfin, a été mesurée l'activité de l'hexokinase (HK), enzyme d'intérêt particulier car elle est la première enzyme limitante de la glycolyse.

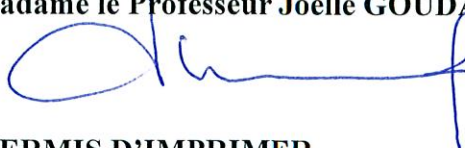
Cette étude expérimentale a permis de montrer pour la première fois que l'infection par le virus BK engendre un effet Warburg-like objectivé par une augmentation de consommation de glucose accompagnée d'une augmentation de la production des lactates par les cellules infectées. L'étude de l'expression des gènes codant pour les différentes enzymes de la glycolyse incite à penser que la modulation du métabolisme du glucose observée dans les cellules infectées par le virus BK ne résulte pas d'une régulation virale au niveau transcriptionnel mais plutôt en aval. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'activité de l'HK est significativement augmentée dans les cellules infectées par le virus BK. Cette augmentation pourrait s'expliquer soit par une augmentation quantitative de l'enzyme et de ses différentes isoformes soit par une augmentation de l'activité intrinsèque par régulation allostérique exercée par une protéine virale ou encore par une modification post-traductionnelle changeant l'affinité de l'enzyme et/ou ses caractéristiques catalytiques. Une variation de la localisation de l'enzyme, connue pour avoir une incidence directe sur l'activité de l'HK, pourrait aussi être une hypothèse. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour mettre en évidence de manière plus précise le mécanisme de régulation de cette enzyme.

A l'inverse les expériences ont montré que le virus de la grippe n'engendrait pas les mêmes modifications métaboliques que le virus BK. En effet, alors que d'importantes modifications ont été mises en évidence au niveau transcriptionnel avec notamment une

répression de la majorité des gènes mais étonnamment une surexpression relative des gènes codant pour les isoformes HK2 et HK3, aucune augmentation de consommation de glucose n'a été observée dans les cellules infectées. En revanche et de manière surprenante une diminution modeste mais significative de la production de lactate est engendrée par l'infection. Le virus de la grippe semble donc être un des rares virus à ne pas engendrer une augmentation de la consommation de glucose. Cela montre que cette modification métabolique n'est pas observée pour toutes les infections virales. Par ailleurs, la modulation du phénomène cellulaire d'autophagie par le virus de la grippe constitue un tout nouveau champ d'investigation. Ce phénomène est à prendre en compte en tant que stratégie répliquative alternative hypothétique. Aussi, une perspective de recherche serait d'analyser l'implication dans l'activation de l'autophagie des différentes isoformes de l'HK, dont nous avons montré que l'expression génétique variait significativement secondairement à l'infection.

Un projet plus ambitieux serait à terme d'étendre le screening métabolique à d'autres modèles viraux pour tenter d'établir des paradigmes de modulation de la glycolyse en fonction des propriétés des infections virales (chronique, latente, résolutive, aigue, cytopathique ou non) et éventuellement des caractéristiques intrinsèques des virus (ARN, ADN, enveloppé, non enveloppé). De plus au delà des données fondamentales, l'étude des mécanismes des changements métaboliques cellulaires engendrés par les infections virales permet d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant non seulement de limiter la réplication virale mais aussi de réguler les dérèglements observés dans certains processus d'oncogenèse et certaines maladies métaboliques.

**Le Président du Jury,
Madame le Professeur Joëlle GOUDABLE**



**VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Lyon, le**

**Vu, la directrice de l'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon
Pour le Président de l'université Claude Bernard**



Professeur Christine VINCIGUERRA



7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sanchez EL, Lagunoff M. Viral activation of cellular metabolism. *Virology*. mai 2015;479–480:609-18.
2. Goodwin CM, Xu S, Munger J. Stealing the Keys to the Kitchen: Viral Manipulation of the Host Cell Metabolic Network. *Trends Microbiol*. décembre 2015;23(12):789-98.
3. Maynard ND, Gutschow MV, Birch EW, Covert MW. The virus as metabolic engineer. *Biotechnol J*. juill 2010;5(7):686-94.
4. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 22 mai 2009;324(5930):1029-33.
5. Munger J, Bennett BD, Parikh A, Feng X-J, McArdle J, Rabitz HA, et al. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol*. oct 2008;26(10):1179-86.
6. Vastag L, Koyuncu E, Grady SL, Shenk TE, Rabinowitz JD. Divergent Effects of Human Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus-1 on Cellular Metabolism. *PLoS Pathog*. juillet 2011;7(7):e1002124.
7. Delgado T, Carroll PA, Punjabi AS, Margineantu D, Hockenbery DM, Lagunoff M. Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 juin 2010;107(23):10696-701.
8. Thai M, Graham NA, Braas D, Nehil M, Komisopoulou E, Kurdistani SK, et al. Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication. *Cell Metab*. avr 2014;19(4):694-701.
9. Miyake-Stoner SJ, O'Shea CC. Metabolism Goes Viral. *Cell Metab*. avr 2014;19(4):549-50.
10. Xiao L, Hu Z, Dong X, Tan Z, Li W, Tang M, et al. Targeting Epstein–Barr virus oncoprotein LMP1-mediated glycolysis sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy. *Oncogene*. 11 sept 2014;33(37):4568-78.
11. Bravard A, Beaumatin J, Luccioni C, Fritsch P, Lefrançois D, Thenet S, et al. Chromosomal, mitochondrial and metabolic alterations in SV40-transformed rabbit chondrocytes. *Carcinogenesis*. mai 1992;13(5):767-72.
12. Li H, Zhu W, Zhang L, Lei H, Wu X, Guo L, et al. The metabolic responses to hepatitis B virus infection shed new light on pathogenesis and targets for treatment. *Sci Rep*. 2015;5:8421.

13. Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *J Virol*. 15 févr 2015;89(4):2358-66.
14. Ramiere C, Rodriguez J, Enache LS, Lotteau V, Andre P, Diaz O. Activity of Hexokinase Is Increased by Its Interaction with Hepatitis C Virus Protein NS5A. *J Virol*. 15 mars 2014;88(6):3246-54.
15. Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters K-A, Proll SC, et al. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog*. janv 2010;6(1):e1000719.
16. Eagle H, Habel K. The Nutritional Requirements for the Propagation of Poliomyelitis Virus by the HeLa Cell. *J Exp Med*. 1 août 1956;104(2):271-87.
17. El-Bacha T, Menezes MMT, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol Cell Biochem*. nov 2004;266(1-2):191-8.
18. Delgado T, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Global Metabolic Profiling of Infection by an Oncogenic Virus: KSHV Induces and Requires Lipogenesis for Survival of Latent Infection. *PLOS Pathog*. août 2012;8(8):e1002866.
19. Yogev O, Lagos D, Enver T, Boshoff C. Kaposi's Sarcoma Herpesvirus MicroRNAs Induce Metabolic Transformation of Infected Cells. *PLOS Pathog*. 25 sept 2014;10(9):e1004400.
20. Woodhouse SD, Narayan R, Latham S, Lee S, Antrobus R, Gangadharan B, et al. Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro. *Hepatology*. août 2010;52(2):443-53.
21. Postic C, Shiota M, Magnuson MA. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:195-217.
22. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*. 15 juin 2003;206(12):2049-57.
23. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the « Warburg effect » and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. février 2009;19(1):17-24.
24. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*. février 2015;22(2):248-57.
25. Neary CL, Pastorino JG. Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells. *J Cell Physiol*. 1 sept 2013;228(9):1943-8.

26. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 7 août 2006;25(34):4683-96.
27. Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM, Miyamoto S. Hexokinase-II Positively Regulates Glucose Starvation-Induced Autophagy through TORC1 Inhibition. *Mol Cell*. février 2014;53(4):521-33.
28. Abrantes JL, Alves CM, Costa J, Almeida FCL, Sola-Penna M, Fontes CFL, et al. Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1). *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. août 2012;1822(8):1198-206.
29. Hollenbaugh JA, Munger J, Kim B. Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4+ T cells and macrophages using LC-MS/MS analysis. *Virology*. 5 juill 2011;415(2):153-9.
30. Fontaine KA, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication. *J Virol*. avr 2014;88(8):4366-74.
31. Kohio HP, Adamson AL. Glycolytic control of vacuolar-type ATPase activity: A mechanism to regulate influenza viral infection. *Virology*. sept 2013;444(1-2):301-9.
32. Parks SK, Chiche J, Pouysségur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. sept 2013;13(9):611-23.
33. Lemeshko VV. VDAC electronics: 1. VDAC-hexo(gluco)kinase generator of the mitochondrial outer membrane potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. mai 2014;1838(5):1362-71.
34. Gardner S, Field A, Coleman D, Hulme B. NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *The Lancet*. juin 1971;297(7712):1253-7.
35. Padgett B, Zurhein G, Walker D, Eckroade R, Dessel B. CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY. *The Lancet*. juin 1971;297(7712):1257-60.
36. Ferber D. Creeping Consensus on SV40 and Polio Vaccine. *Science*. 25 oct 2002;298(5594):725-7.
37. Topalis D, Andrei G, Snoeck R. The large tumor antigen: A « Swiss Army knife » protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral Res*. février 2013;97(2):122-36.
38. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, et al. Identification of a Third Human Polyomavirus. *J Virol*. 15 avr 2007;81(8):4130-6.

39. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e64.
40. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *J Virol.* oct 2012;86(19):10321.
41. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology.* févr 2013;436(2):295-303.
42. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host Microbe.* juin 2010;7(6):509-15.
43. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, et al. A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *J Virol.* 1 mai 2011;85(9):4586-90.
44. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science.* 22 févr 2008;319(5866):1096-100.
45. van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. *Imperiale MJ, éditeur. PLoS Pathog.* 29 juill 2010;6(7):e1001024.
46. Faust H, Pastrana DV, Buck CB, Dillner J, Ekstrom J. Antibodies to Merkel Cell Polyomavirus Correlate to Presence of Viral DNA in the Skin. *J Infect Dis.* 15 avr 2011;203(8):1096-100.
47. McNees AL, Vilchez RA, Heard TC, Sroller V, Wong C, Herron AJ, et al. SV40 lymphomagenesis in Syrian golden hamsters. *Virology.* févr 2009;384(1):114-24.
48. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene.* 11 août 2003;22(33):5192-200.
49. Vilkin A, Ronen Z, Levi Z, Morgenstern S, Halpern M, Niv Y. Presence of JC Virus DNA in the Tumor Tissue and Normal Mucosa of Patients with Sporadic Colorectal Cancer (CRC) or with Positive Family History and Bethesda Criteria. *Dig Dis Sci.* 10 août 2011;57(1):79-84.
50. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK Virus and Human Cancer: Innocent until Proven Guilty. *Semin Cancer Biol.* août 2009;19(4):252.
51. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol.* avr 2012;13(4):339-40.

52. An P, Sáenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:213-36.
53. DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol.* avril 2013;11(4):264-76.
54. Neu U, Allen S-AA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, et al. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003688.
55. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol.* févr 2006;80(3):1361-6.
56. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol.* août 2007;81(16):8552-62.
57. Nakanishi A, Shum D, Morioka H, Otsuka E, Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol.* sept 2002;76(18):9368-77.
58. *Fields Virology (Knipe, Fields Virology)-2 Volume Set* by Knipe, David M. Published by Lippincott Williams & Wilkins 6th (sixth), 2-volume set edition (2013) Hardcover. Lippincott Williams & Wilkins;
59. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis.* 15 mars 2009;199(6):837-46.
60. Polo C, Pérez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubò J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2004;10(7):640-4.
61. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology.* févr 2009;384(2):266-73.
62. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation.* 15 janv 1999;67(1):103-9.
63. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* nov 2008;8(11):2368-77.
64. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mars 2013;13 Suppl 4:179-88.

65. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 15 août 2002;347(7):488-96.
66. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* août 2005;5(8):1926-33.
67. Limaye AP, Smith KD, Cook L, Groom DA, Hunt NC, Jerome KR, et al. Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mars 2005;5(3):614-20.
68. Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* janv 2008;41(1):11-8.
69. Leung AYH, Yuen K-Y, Kwong Y-L. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant.* déc 2005;36(11):929-37.
70. Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang M-L, Myerson D, et al. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 1 août 2005;106(3):1130-2.
71. Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisher K. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* juill 1997;20(2):163-5.
72. Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, Korálnik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, et al. BK-Related Polyomavirus Vasculopathy in a Renal-Transplant Recipient. *N Engl J Med.* 25 oct 2001;345(17):1250-5.
73. Medeiros PV, Abagge KT, Carvalho VO, Bonfim CM, Raboni SM. Polyomavirus BK: possibly associated skin eruption in a patient with hemorrhagic cystitis. *Pediatr Dermatol.* févr 2011;28(1):76-7.
74. Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nিকেleit V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. *J Virol.* janv 2014;88(1):559-73.
75. Jeffers L, Webster-Cyriaque JY. Viruses and salivary gland disease (SGD): lessons from HIV SGD. *Adv Dent Res.* avr 2011;23(1):79-83.
76. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* 15 mars 2013;437(2):63-72.
77. Noch E, Sariyer IK, Gordon J, Khalili K. JC virus T-antigen regulates glucose metabolic pathways in brain tumor cells. *PloS One.* 2012;7(4):e35054.

78. Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology*. juin 2004;323(2):182-8.
79. Zeng G, Bueno M, Camachos CJ, Ramaswami B, Luo C, Randhawa P. Validation of BKV large T-antigen ATP-binding site as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* février 2009;81(2):184-7.
80. Randhawa P, Zeng G, Bueno M, Salgarkar A, Lesniak A, Isse K, et al. Inhibition of large T antigen ATPase activity as a potential strategy to develop anti-polyomavirus JC drugs. *Antiviral Res.* déc 2014;112:113-9.
81. Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, Gillen D, Harland R, Thistlewaite JR, et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med.* 17 mars 2005;352(11):1157-8.
82. Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res.* oct 2011;92(1):115-23.
83. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Kim SJ, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA.* 26 nov 2014;312(20):2106-14.
84. Josephson MA, Gillen D, Javaid B, Kadambi P, Meehan S, Foster P, et al. Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation.* 15 mars 2006;81(5):704-10.
85. Stegmann T, White JM, Helenius A. Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J.* déc 1990;9(13):4231-41.
86. Josset L, Frobert E, Rosa-Calatrava M. Influenza A replication and host nuclear compartments: Many changes and many questions. *J Clin Virol.* déc 2008;43(4):381-90.
87. Velthuis AJW te, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol.* août 2016;14(8):479-93.
88. Vreede FT, Fodor E. The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off. *Virulence.* oct 2010;1(5):436-9.
89. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* août 2011;9(8):590-603.
90. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Yao D, et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* janv 2012;1824(1):186-94.

91. Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, Shepherd KR, Jiao Y, Webster R, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 18 août 2009;106(33):14063-8.
92. Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, Solórzano A, Zeng H, Perrone LA, et al. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 févr 2008;105(8):3064-9.
93. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 janv 2009;106(2):588-92.
94. Varga ZT, Ramos I, Hai R, Schmolke M, García-Sastre A, Fernandez-Sesma A, et al. The Influenza Virus Protein PB1-F2 Inhibits the Induction of Type I Interferon at the Level of the MAVS Adaptor Protein. Pekosz A, éditeur. *PLoS Pathog*. 9 juin 2011;7(6):e1002067.
95. Wang S, Le TQ, Kurihara N, Chida J, Cisse Y, Yano M, et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis*. 1 oct 2010;202(7):991-1001.
96. Warren-Gash C, Smeeth L, Hayward AC. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. oct 2009;9(10):601-10.
97. Mamas MA, Fraser D, Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int J Cardiol*. 28 nov 2008;130(3):304-9.
98. Ichiyama T, Morishima T, Kajimoto M, Matsushige T, Matsubara T, Furukawa S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J*. juin 2007;26(6):542-4.
99. Kido H, Indalao IL, Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E. Energy metabolic disorder is a major risk factor in severe influenza virus infection: Proposals for new therapeutic options based on animal model experiments. *Respir Investig*. sept 2016;54(5):312-9.
100. Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe*. 25 juin 2010;7(6):427-39.
101. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJS, Matsuoka Y, Tomita Y, et al. Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development. *Cell Host Microbe*. décembre 2014;16(6):795-805.
102. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov*. déc 2006;5(12):1015-25.

103. McKimm-Breschkin JL, Fry AM. Meeting report: 4th ISIRV antiviral group conference: Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses. *Antiviral Res.* mai 2016;129:21-38.
104. Moscona A. Oseltamivir Resistance — Disabling Our Influenza Defenses. *N Engl J Med.* décembre 2005;353(25):2633-6.
105. Nicoll A, Ciancio B, Kramarz P, Influenza Project Team. Observed oseltamivir resistance in seasonal influenza viruses in Europe interpretation and potential implications. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 31 janv 2008;13(5).
106. Ritter JB, Wahl AS, Freund S, Genzel Y, Reichl U. *BMC Syst Biol.* 2010;4:61.
107. Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine.* août 2006;24(35-36):6074-87.
108. Genzel Y, Behrendt I, König S, Sann H, Reichl U. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. *Vaccine.* 2 juin 2004;22(17-18):2202-8.
109. Petiot E, Jacob D, Lanthier S, Lohr V, Ansorge S, Kamen AA. Metabolic and Kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. *BMC Biotechnol.* 1 sept 2011;11:84.
110. Chowell G, Ayala A, Berisha V, Viboud C, Schumacher M. Risk factors for mortality among 2009 A/H1N1 influenza hospitalizations in Maricopa County, Arizona, April 2009 to March 2010. *Comput Math Methods Med.* 2012;2012:914196.
111. Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine Dichloroacetate, a Novel Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Inhibitor, as a Potential Therapeutic Agent for Metabolic Disorders and Multiorgan Failure in Severe Influenza. *PLOS ONE.* mai 2014;9(5):e98032.
112. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory Effect of Gamma Interferon on BK Virus Gene Expression and Replication. *J Virol.* 1 janv 2007;81(1):272-9.
113. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *J Virol.* 1 févr 2009;83(3):1350-8.
114. Broekema NM, Imperiale MJ. Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. *Virology.* 20 janv 2012;422(2):235-41.
115. Brinkert F, Briem-Richter A, Ilchmann C, Kemper MJ, Ganschow R. Prevalence of polyomavirus viraemia (JC virus/BK virus) in children following liver transplantation. *Pediatr Transplant.* février 2010;14(1):105-8.
116. Marbach EP, Weil MH. Rapid Enzymatic Measurement of Blood Lactate and Pyruvate Use and Significance of Metaphosphoric Acid as a Common Precipitant. *Clin Chem.* 1 avr 1967;13(4):314-25.

117. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
118. Goldberg MS, Sharp PA. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J Exp Med*. 13 févr 2012;209(2):217-24.
119. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 1 avr 2009;55(4):611-22.
120. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. mars 2004;26(6):509-15.
121. Monakhov NK, Neistadt EL, Shavlovskil MM, Shvartsman AL, Neifakh SA. Physicochemical properties and isoenzyme composition of hexokinase from normal and malignant human tissues. *J Natl Cancer Inst*. juill 1978;61(1):27-34.
122. Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol*. juillet 2000;27(1-2):43-52.
123. Zhao F-Q, Keating AF. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Curr Genomics*. avr 2007;8(2):113-28.
124. Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige J-J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 15 sept 2011;22(18):3366-78.
125. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*. juin 2011;1807(6):568-76.
126. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 13 mars 2008;452(7184):230-3.
127. Filipp F. Cancer metabolism meets systems biology: Pyruvate kinase isoform PKM2 is a metabolic master regulator. *J Carcinog*. 2013;12(1):14.
128. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2007;(4):99-124.
129. Wu X, Zhou Y, Zhang K, Liu Q, Guo D. Isoform-specific interaction of pyruvate kinase with hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett*. juin 2008;582(15):2155-60.

130. Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle*. avril 2010;9(7):1295-307.
131. Zhang R, Chi X, Wang S, Qi B, Yu X, Chen J-L. The Regulation of Autophagy by Influenza A Virus. *BioMed Res Int*. 23 mars 2014;2014:e498083.
132. Lin G, Andrejeva G, Wong Te Fong A-C, Hill DK, Orton MR, Parkes HG, et al. Reduced Warburg effect in cancer cells undergoing autophagy: steady-state ¹H-MRS and real-time hyperpolarized ¹³C-MRS studies. *PloS One*. 2014;9(3):e92645.
133. Fodor E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol*. 2013;57(02):113-22.
134. Sikora D, Rocheleau L, Brown EG, Pelchat M. Deep sequencing reveals the eight facets of the influenza A/HongKong/1/1968 (H3N2) virus cap-snatching process. *Sci Rep*. 26 août 2014;4:6181.
135. Janke R, Genzel Y, Wetzel M, Reichl U. Effect of influenza virus infection on key metabolic enzyme activities in MDCK cells. *BMC Proc*. 22 nov 2011;5(Suppl 8):P129.
136. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ*. décembre 2007;15(3):521-9.



L'ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses : ces opinions sont considérées comme propres à l'auteurs.

CHARRE Caroline

Modulation de la glycolyse cellulaire par les virus BK et influenza

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2016, p. 98

RESUME

L'étude de la modulation par les infections virales du métabolisme cellulaire notamment glycolytique est un nouveau champ d'investigation. Il a été démontré que plusieurs virus modulent la glycolyse et engendrent dans la majorité des cas son augmentation pour assurer en partie la réplication et la production de nouveaux virions. Néanmoins les mécanismes sous-jacents restent mal compris et semblent différer d'un virus à l'autre.

La présente étude a eu pour but d'investiguer les effets de l'infection virale sur la glycolyse. Deux virus très différents et peu étudiés d'un point de vue métabolique ont été choisis : le virus BK et le virus Influenza de type A. Pour déceler les cibles potentielles de régulation au niveau transcriptionnel, nous avons évalué l'expression des gènes codant pour la majorité des enzymes de la glycolyse ainsi que pour ses principaux régulateurs. Au niveau protéique, l'activité de l'hexokinase (HK), première enzyme limitante de la glycolyse, a été mesurée. Pour la première fois a été montré que l'infection par le virus BK active la glycolyse aérobie. Parallèlement a été mise en évidence l'augmentation de l'activité de l'HK, mécanisme possible de cette modification métabolique. A l'inverse, le virus Influenza de type A n'active pas la glycolyse aérobie. Néanmoins, d'importantes variations transcriptionnelles ont été observées, notamment au niveau de l'expression des gènes codant pour les différentes isoformes de l'HK. Ces résultats tendent à montrer que la modulation de la glycolyse diffère d'un virus à l'autre tant au niveau de l'effet que des mécanismes intrinsèques.

MOTS CLES

Infection virale
Métabolisme
Glycolyse
Effet Warburg

JURY

Mme GOUDABLE Joëlle, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mr ANDRE Patrice, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mr GONZALO Philippe, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mme SCHOLTES Caroline, Docteur en Pharmacie, Maître de conférence - Praticien Hospitalier
Mr RAMIERE Christophe, Docteur en Médecine, Maître de conférence - Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE Mardi 5 octobre 2016

ADRESSE DE L'AUTEUR 6, petite rue des Feuillants -- 69001 LYON