ENS DE LYON

N° d'ordre Année 2012

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon - Université de Lyon

Discipline : Sciences de la Vie

Laboratoire INSERM U851

École Doctorale Biologie Moléculaire Cellulaire et Intégrative

présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2012

par Mlle Amandine VERGA-GERARD

Perturbations de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du virus de l'hépatite C, Impact sur la carcinogenèse

---

Directeur de thèse : Dr Vincent LOTTEAU
Co-encadrante : Dr Laure PERRIN-COCON

Après l'avis de : Dr Marie-Françoise BOURGEADE
Dr Pierre-Olivier VIDALAIN

Devant la commission d'examen formée de :

Dr Marie-Françoise BOURGEADE, rapporteur
Dr Pierre-Olivier VIDALAIN, rapporteur
Pr Sylvie RICARD-BLUM, examinateur
Pr Renaud MAHIEUX, examinateur
Dr Vincent LOTTEAU, examinateur

Perturbations de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du virus de l'hépatite C, impact sur la carcinogenèse.

L'infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) conduit au développement de pathologies hépatiques, telles que la fibrose dont le terme évolutif est la cirrhose sur laquelle peut se développer un carcinome hépatocellulaire. Les observations cliniques indiquent que le VHC interfère avec la voie de signalisation du Transforming Growth Factor β (TGFβ). Entre autres fonctions, cette cytokine induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), ce qui favorise la migration cellulaire et l'invasion tumorale. Le but de cette thèse est d'analyser l'impact des protéines non structurales du VHC sur la voie de signalisation du TGFβ.

Nous avons montré que le réplicon subgénomique du VHC induit une augmentation de la signalisation du TGFβ résultant en une plus forte expression de gènes associés à l'EMT et induisant un phénotype d'EMT. L'expression de la protéase virale NS3-4A seule, augmente et prolonge la phosphorylation de Smad2/3 en aval du récepteur du TGFβ et renforce l'expression de certains gènes cibles du TGFβ. L'analyse des interactions entre les protéines du VHC et les protéines de la voie du TGFβ a permis d'identifier l'interaction entre NS3-4A et la protéine Smurf2. Le réplicon subgénomique ou la protéase NS3-4A ont des rôles antagonistes à la protéine Smurf2 sur la voie de signalisation du TGFβ. L'analyse globale des gènes régulés par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique a permis d'identifier, que dans ces cellules, le TGFβ induit une réponse pro-tumorale.

Ces résultats montrent que NS3-4A induit une plus forte réponse des cellules au TGFβ, en inhibant la fonction de Smurf2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie du TGFβ. Ce nouveau mécanisme d'interférence du VHC avec la voie du TGFβ pourrait contribuer à l'EMT des cellules hépatocytaires infectées favorisant ainsi la cancérisation. Ce travail apporte de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes associés à la cancérisation chez les patients chroniquement infectés par le VHC.

Disruption of TGFβ signaling pathway by hepatitis C virus proteins, impact on carcinogenesis

Chronic infection by hepatitis C virus (HCV) leads to the development of hepatic diseases like fibrosis which evolves into cirrhosis on which can develop hepatocellular carcinoma. Clinical observations indicate that HCV interferes with the TGFβ signaling pathway. Among other functions this cytokine induces epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) promoting cell migration and tumor invasion. The aim of this study is to analyze the impact of HCV non structural proteins on TGFβ signaling pathway.

We have demonstrated that the HCV subgenomic replicon induces an enhancement of the TGFβ signaling pathway resulting in a strong expression of EMT associated genes and inducing EMT phenotype. The expression of the NS3-4A viral protein alone enhances and stabilizes Smad2/3 phosphorylation downstream TGFβ receptor and increases the expression of some TGFβ target genes. The analysis of interactions between HCV proteins and proteins of the TGFβ signaling pathway has shown the interaction of NS3-4A with Smurf2 protein. HCV subgenomic replicon and NS3-4A have antagonistic roles to Smurf2 on TGFβ signaling pathway. The global analysis of genes regulated by TGFβ in cells expressing HCV subgenomic replicon indicates that in these cells TGFβ induces a pro-tumor answer.

These results show that NS3-4A enhances TGFβ answer by inhibiting Smurf2 functions in the negative feedback loop of the TGFβ pathway. This new mechanism of HCV interference with the TGFβ pathway can contribute to EMT in infected hepatocytes thus promoting carcinogenesis. This work provides new leads to understand the mechanisms associated to carcinogenesis in HCV chronically infected patients.

REMERCIEMENTS

La thèse est un travail de longue haleine qui ne peut aboutir sans la collaboration de nombreuses personnes. Je vais m'efforcer ici de remercier toute les personnes qui ont contribué à cette thèse de près ou de loin et sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

Je voudrais commencer par remercier Vincent Lotteau et Patrice André de m'avoir accueillie dans leur équipe et de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je remercie plus particulièrement Vincent Lotteau qui a encadré cette thèse et permis son bon déroulement.

Je remercie également Laure Perrin-Cocon, co-encadrante de cette thèse pour son suivi et son soutien au quotidien.

Je tiens aussi à remercier la Ligue Nationale contre le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale pour leurs financements indispensables à la réalisation de ces quatre années de thèse.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon jury de thèse : Marion Bourgeade, Renaud Mahieux, Sylvie Ricard-Blum et Pierre-Olivier Vidalain. Et particulièrement aux deux rapporteurs Marion Bourgeade et Pierre-Olivier Vidalain pour l'attention qu'ils ont porté à mon manuscrit de thèse et pour leurs remarques constructives.

Je voudrais aussi dire un grand Merci à Marine Porcherot. Même si certaines pistes se sont révélées infructueuses, ce travail serait beaucoup moins abouti sans son aide, donc merci Marine.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de l'équipe que j'ai côtoyé quotidiennement ou presque durant cette thèse : Claire, Christophe, Olivier, Caroline et Liviu. Merci pour toutes ces découvertes musicales et pour la bonne humeur qui régnait au laboratoire. J'ai une pensée particulière pour Martine qui aura toujours été là quand j'avais besoin de bavarder un peu pour me changer les idées, sa présence manque au laboratoire.

Je remercie également le reste de l'équipe, j'ai apprécié tous les conseils et remarques qui ont permis à cette thèse d'avancer. J'adresse particulièrement mes remerciements à Laurène pour toutes ses réponses indispensables à mes questions de bioinformatique même les plus incongrues.

Je remercie aussi les anciens de l'équipe et particulièrement Vinca et Fabrine pour leurs nombreux conseils au début de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des personnes qui travaillent au 5ème étage de la tour CERVI pour ces moments d'échanges entre 2 portes. Un remerciement particulier pour les « Kinders » de l'équipe A2I, merci pour le chocolat et les discussions autour d'un café ou d'un thé.

Je remercie aussi l'ensemble du secrétariat : Alexandra, Anaïs, Céline et Véronique. Merci les filles pour votre gentillesse et votre sourire toujours présent.

Je remercie également l'ensemble des personnes que j'ai pu croiser au cours de ces quatre ans notamment au coin repas du 4ème étage.

J'adresse aussi mes remerciements au personnel du PLATIM pour m'avoir initié à la microscopie confocale et à la vidéomicroscopie ainsi qu'à Bariza Blanquier pour son aide dans la compréhension de mes résultats de PCR quantitative.

Je remercie également les bénévoles de « Moi j'm'en fous je triche » pour m'avoir apporté de la bonne humeur et un soutien inestimable durant ces années de thèse. En particulier Judith, Matthieu, Maël, Grégoire, Clément et Mary.

Je tiens aussi à me remercier toute ma famille et particulièrement mes parents et mes sœurs pour leur soutien tout au long de mes années d'études et leurs nombreuses relectures de ce manuscrit.

Pour finir, je tiens à dire un immense merci à Thomas pour m'avoir supportée et soutenue au quotidien. Son énergie, son optimisme et son humour m'auront permis de garder le sourire même dans les moments difficiles. Merci Thomas pour ta présence à mes côtés, maintenant c'est le début d'une nouvelle aventure.

TABLE DES MATIERES

Abréviations 10
Avant-propos 12
Introduction 14

I. Le virus de l'hépatite C et les maladies du foie associées 15

1. Généralités 15

a. Découverte 15
b. L'hépatite C aujourd'hui 15
c. Variabilité génétique du VHC 16
d. Les formes circulantes du VHC 17
e. Le cycle viral 18

2. Les protéines 18

a. Les protéines structurales 19
b. Les protéines non structurales 21
c. L'interactome homme/VHC 25

3. Histoire naturelle de l'infection par le VHC 27

a. L'hépatite C chronique 28
b. Fibrose et Cirrhose 29
c. Carcinome hépatocellulaire 31

II. La voie de signalisation du TGFβ 35

1. Généralités 35

a. Les différents ligands 35
b. Activation et synthèse du TGFβ 36

2. La voie de signalisation du TGFβ dépendant des protéines Smad 37

a. Description de la voie de signalisation canonique du TGFβ 37
b. Les protéines Smad 38
c. Les gènes régulés 39

3. Liens entre la voie de signalisation du TGFβ et d'autres voies de signalisation 40

a. Activation d'autres effecteurs par le TGFβ 40
b. Activation des protéines Smad par d'autres protéines kinases 41

4. Régulation de la voie de signalisation du TGFβ 42

a. Régulation de la localisation subcellulaire des acteurs de la voie de signalisation 42
b. Régulation par la protéine Smad7 44
c. Régulation au niveau du complexe R-Smad/Smad4 46
d. Régulation par ubiquitination et ubiquitination-like 47
e. Les rôles de la protéine Smurf2 48

III. Le TGFβ dans les maladies du foie associées à l'infection par le VHC 52

1. La cytokine TGFβ et l'infection par le VHC 52

a. Impact du VHC sur la synthèse et l'activation du TGFβ 52

b. Impact du TGFβ sur la réplication virale 53
2. Le TGFβ et la fibrose du foie 53
a. Généralités 53
b. Influence du VHC dans l'induction de la fibrose du foie dépendant du TGFβ 56
3. Le TGFβ et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) 57
a. Généralités 57
b. Mécanismes d'induction de l'EMT par le TGFβ 59
c. L'EMT dans le foie 61
d. L'EMT chez les patients infectés par le VHC 62
4. Le TGFβ et la cancérisation : Dr Jekyll et Mr Hyde 63
a. Les effets anti-tumoraux du TGFβ 64
b. Les effets pro-tumoraux du TGFβ 65
c. Le TGFβ et le CHC 66
Travail experimental 69
I. Le réplicon subgénomique augmente la réponse des cellules au TGFβ et induit un phénotype d'EMT 70
1. Impact du réplicon subgénomique du VHC sur la réponse des cellules au TGFβ ... 70
a. Objectifs 70
b. Résultats 70
2. L'expression de la protéine Smurf2 contrebalance l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ 75
a. Analyse de l'interactome centré sur Smurf2 76
b. Impact de l'expression de Smurf2 sur la réponse des cellules au TGFβ 78
c. Le réplicon subgénomique n'augmente pas le TGFβ actif présent dans le milieu 80
II. Le ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC 82
1. Introduction 82
2. Résultats 83
a. La protéine NS3 cible les acteurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ chez la levure 83
b. NS3 et NS3-4A interagissent avec Smad2, Smad3 et Smurf2 en cellules humaines 85
3. Conclusion 86
III. L'expression de NS3-4A augmente la réponse des cellules au TGFβ 89
1. Impact de l'expression de NS3-4A sur la réponse des cellules au TGFβ 89
a. Objectifs 89
b. La protéine NS3-4A augmente la transcription des gènes cibles du TGFβ 89
c. Impact de la protéine NS3-4A sur la phosphorylation des protéines R-Smad ... 92
2. La protéine Smurf2 influence l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ 94
a. Objectifs 94
b. NS3-4A et Smurf2 ont des rôles antagonistes sur la voie de signalisation du TGFβ 95

c. Etude des mécanismes potentiels 97
3. Impact de la dimérisation de NS3-4A sur l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ 101
IV. Le TGFβ régule l'expression de gènes associés à la carcinogenèse dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique 104
1. Objectifs 104
2. Les termes GO associés aux gènes régulés par le TGFβ diffèrent entre les 2 lignées. 104
3. Focus sur des gènes spécifiques de la réponse au TGFβ dans les cellules Huh9.13 ou Huh9.13-cured 110
a. Dans les cellules contrôles Huh9.13-cured 110
b. Dans les cellules Huh9.13 113
4. Conclusion 116
Conclusion et Discussion 118
1. Mécanismes d'interférence de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ 118
2. Impact de NS3-4A sur les fonctions de Smurf2 121
3. Le TGFβ induit un état pro-tumoral des cellules exprimant les protéines du VHC 123
4. Synthèse 127
Materiels et méthodes 131
Références 143
Annexes 162
Annexe 1 : liste des gènes régulés par leTGFβ dans les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured (FC) 163
Annexe 2 : Termes GO associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured 170
Annexe 3 : Arbre GO associant les 76 termes GO significativement associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ 176
Annexe 4 : article soumis à Journal of Hepatology « direct targeting of Smurf2 by HCV enhances TGFβ signaling and promotes Epithelial-to-mesenchymal transition » 181

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure du génome du VHC. 19
Figure 2 : Modèle putatif du changement de conformation induit par l'association de NS4A à NS3 et repliement final du complexe NS3-4A. 22
Figure 3 : Interactome homme/VHC. 26
Figure 4 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC. 27
Figure 5 : Mécanismes d'induction du CHC.. 33
Figure 6 : Relation entre les cytokines de la famille du TGFβ, les récepteurs et les protéines Smad. 35
Figure 7 : Sécrétion et activation du TGFβ.. 36
Figure 8 : Voie de signalisation du TGFβ. 37
Figure 9 : Domaines et phosphorylations des protéines R-Smad, Smad4 et Smad7.. 38
Figure 10 : Régulation de l'expression des gènes et intégration du signal. 40
Figure 11 : Régulation de la voie de signalisation du TGFβ. 43
Figure 12 : La protéine Smurf2. 48
Figure 13 : Les différentes fonctions de la protéine Smurf2. 50
Figure 14 : Impact du TGFβ sur la fibrogenèse du foie. 54
Figure 15 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse. 58
Figure 16 : Régulation transcriptionnelle de l'EMT induit par le TGFβ. 59
Figure 17 : Impact du TGFβ dans le processus de cancérisation. 64
Figure 18 : Le réplicon subgénomique induit une plus forte régulation de PAI-1 par le TGFβ mais n'a pas d'impact sur la régulation de Smad7.. 71
Figure 19 : Régulation de l'expression de gènes de l'EMT par le TGFβ dans les lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured. 72
Figure 20 : Fold change induit par le TGFβ dans les deux lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured pour les gènes du PCR-array associés à « la différenciation et au développement » et à « la croissance cellulaire et la prolifération ». 74
Figure 21 : Le TGFβ induit une plus forte polymérisation des fibres d'actine dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique. 75
Figure 22 : Représentation graphique du réseau des interactions protéine-protéine centré sur la protéine Smurf2 montrant ses partenaires cellulaires directs. 76
Figure 23 : La surexpression de Smurf2 inhibe l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la réponse des cellules au TGFβ. 78
Figure 24 : L'extinction d'expression de Smurf2 mime l'effet amplificateur du réplicon subgénomique en présence du TGFβ. 79
Figure 25 : Dosage du TGFβ actif dans le milieu de culture des Huh9.13-cured et des Huh9.13. 81
Figure 26 : Matrice double hybride chez la levure pour la protéine virale NS3. 84
Figure 27 : Co-immunoprécipitation en cellules 293T. 86
Figure 28 : Ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC. 88
Figure 29 : NS3-4A amplifie la signalisation du TGFβ. 90
Figure 30 : NS3-4A augmente l'expression de PAI-1 et la polymérisation des fibres d'actine induites par le TGFβ.. 91
Figure 31 : L'effet amplificateur de NS3-4A dépend de l'activation de TβRI.. 93
Figure 32 : La protéine NS3-4A augmente et stabilise la phosphorylation des protéines R-Smad. 94

Figure 33 : La surexpression de Smurf2 inhibe l'effet amplificateur de NS3-4A.. 95
Figure 34 : L'extinction d'expression de Smurf2 mime l'effet amplificateur de NS3-4A. 96
Figure 35 : L'activité ubiquitine ligase de Smurf2 n'est pas impliquée dans la suppression de l'effet amplificateur de NS3-4A. 98
Figure 36 : Impact de l'expression de NS3-4A sur la localisation subcellulaire de TβR et son activité.. 100
Figure 37 : L'inhibition de la dimérisation de NS3-4A bloque l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ. 102
Figure 38 : Gènes régulés par le TGFβ dans les Huh9.13 et les Huh9.13-cured. 107
Figure 39 : Termes GO associés aux gènes régulés positivement et négativement par le TGFβ dans les deux lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured. 109
Figure 40 : Le ciblage de Smurf2 par le VHC est associé à l'induction d'un état pro-tumoral par le TGFβ.. 127
Figure 41 : Elimination du réplicon subgénomique dans la lignée Huh9.13 cured. 131
Figure 42 : Principe du double hybride chez la levure.. 133
Figure 43 : Vérification de l'efficacité du si-ARNcontre Smurf2. 135

ABREVIATIONS

3-AT	3 amino triazol
ANGPTL4	Angiopoétine like 4
AP1	Protéine activateur 1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH	Basique hélice boucle (loop) hélice
BMP	Bone morphogenic protein
BRET	Transfert d'énergie entre molécules bioluminescentes (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)
Cdc	Protéine de contrôle de la division cellulaire
CDK	Cycline dépendante kinase
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CTGF	Connective tissue growth factor
DUSP	Dual specificity protein phosphatase 1
EBV	Virus Epstein-Barr
EGF	Facteur de croissance épithélial
EMT	Transition épithélio-mesenchymateuse
EREG	Epireguline
NRP2	Neuropiline 2
FC	Fold change
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Gal4-AD	Gal4 activation domain
Gal4-DB	Gal4 binding domain
GO	Gene ontology
GSK-3β	Glycogene synthetase kinase 3 β
GTPase	Guanosine triphosphatase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF1α	Hypoxia inducible factor 1 α
HRP	Horseradish peroxidase
HPV	Human papilloma virus
HSC	Hepatic stellate cell ou cellule étoilée hépatique
IASPP	Inhibitor of Apoptosis Stimulating Protein of p53
IFN	Interféron
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IL	Interleukine
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus kinase
JNK	C-Jun N-terminal Kinase
KLF10	krüppel-like factor 10
LAP	Latency-associated peptide
LDL	Low-density-lipoprotéine
LT	Lymphocyte T
LTBP	Latent TGFβ binding protein
LVP	Lipo-viro-particules
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAVS	Protéine mitochondriale de signalisation antivirale

MEC	Matrice extracellulaire
MES	2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid
MH	Mad homologie
mi-R	Micro-RNA
MKP2	MAPK phosphatase 2
MMP	Matrix-metallo proteinase
MTMR4	Myotubularine phosphatase 4
NANBH	Hépatites non A non B
NK	Natural killer
NS	Non structurale
NTP	Nucléosite triphosphate
ORF	Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
PBS	Tampon phosphate salin
PCA	Protein complementation assay
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PP5	Protéine phosphatase 5
PPM1A	Protéine phosphatase 1A
PPP1R13L	Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 13 Like
RIG-I	Gène inductible par l'acide rétinoique I
ROS	Reactive oxygen species
SARA	Smad anchor for receptor activation
SBE	Elément de réponse aux protéines Smad
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Erreur standard
SGK1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1
Ski	Sloan-Kettering institute proto-oncogène
Smurf	Smad ubiquitin related factor
SnoN	Ski-related novel gene N
SR-B1	Scavenger receptor B1
STAT	Signal-transducer and activator of transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier
TC-PTP	Protéine tyrosine phosphatase des cellules T
TGFβ	Facteur de croissance transformant β ou transforming growth factor β
TGIF	TGFβ interacting factor
TIEG1	TGFβ inducible early gene 1
TIMP	Tissue inhibitor of matrix-metallo proteinase
TNFα	Tumor necrosis factor α
TRIF	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon β
TβR	Récepteur au TGFβ
UTR	Untranslated region
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus d'immunodéficience humain
VLDL	Very low density lipoprotein
WB	Western blot
YFP	Yellow fluorescent protein

AVANT-PROPOS

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est un problème de santé publique. En effet, environ 200 millions de personnes sont infectées dans le monde. L'infection par le VHC devient chronique dans 80% des cas. Cette infection chronique conduit au développement de nombreuses maladies hépatiques telles que la fibrose, la cirrhose ou encore le carcinome hépatocellulaire (CHC). La progression silencieuse de ce virus fait qu'à l'heure actuelle le nombre de patients chroniquement infectés développant un CHC est en pleine expansion. Il est donc crucial d'identifier les mécanismes conduisant à la cancérisation afin de pouvoir développer de nouvelles thérapies.

Les approches de biologie systémique permettent d'obtenir une vision plus globale des perturbations induites par une infection virale. Le projet IMAP (Infection MAPing project) réalisé au laboratoire a permis d'étudier les interactions entre les protéines du VHC et le protéome humain. 484 interactions ont ainsi été identifiées entre les protéines virales et 421 protéines humaines à partir de cribles double-hybride et des données de la littérature vérifiées au laboratoire.

L'analyse de l'interactome homme/VHC a permis de mettre en évidence un important ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC. Ce ciblage est cohérent avec les observations cliniques, en effet, chez les patients chroniquement infectés, le taux de TGFβ circulant est plus important. De plus l'augmentation du taux de TGFβ est associée avec la fibrogenèse du foie chez les patients infectés par le VHC.

C'est à partir de la mise en évidence de ce ciblage que le projet d'étude des perturbations de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC a démarré au sein du laboratoire en janvier 2008.

Le TGFβ est une cytokine multifonctionnelle. Cette cytokine est notamment impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose ou encore dans la régulation de la réponse immune. Durant la carcinogenèse, le TGFβ joue un rôle ambivalent. Dans les étapes précoces, le TGFβ inhibe le développement tumoral en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Tandis que dans les stades tardifs il favorise le développement tumoral en induisant la prolifération cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et le développement métastatique.

La fonction du TGFβ dépend fortement du contexte cellulaire. L'analyse de la littérature au début de ce projet a mis en évidence que toutes les études d'impact des protéines virales sur la réponse au TGFβ dans les hépatocytes concernaient principalement l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire induits par le TGFβ. Au cours de ma thèse, les évidences de l'importance de l'EMT dans les hépatocytes durant le CHC se sont révélées de plus en plus nombreuses. Trois études (dont deux publiées en 2012) ont analysé l'impact des protéines virales dans l'induction de l'EMT et mis en évidence que le VHC favorise l'induction d'EMT dans les hépatocytes.

Mon travail de thèse apporte de nouveaux éléments afin de mieux comprendre l'impact des protéines virales dans l'induction de l'EMT par le TGFβ dans les hépatocytes. En effet les objectifs de mon travail de thèse ont été :

- d'analyser de manière globale les interactions entre les acteurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ et les protéines du VHC.
- d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'expression des protéines non structurales sur la voie de signalisation du TGFβ.
- d'identifier les mécanismes associés à l'impact des protéines virales sur la voie de signalisation du TGFβ.

INTRODUCTION

I. Le virus de l'hépatite C et les maladies du foie associées

1. Généralités

a. Découverte

La découverte du virus de l'hépatite C (VHC) a procédé par étapes. Dès l'année 1974, Feinstone a mis en évidence un agent infectieux causant des hépatites non A non B (NANBH) (Feinstone et al., 1975). En 1978, Alter et son équipe montrèrent que le sérum de quatre patients atteints de NANBH pouvait infecter des chimpanzés, démontrant ainsi qu'au moins un des agents des NANBH était un agent transmissible (Alter et al., 1978). Par ailleurs, le fait que le sérum de patients atteints d'une hépatite chronique restait infectieux montrait que le nouvel agent était actif à long terme. Bien que l'infection de chimpanzés par le VHC ne conduise pas à la même pathologie que chez l'homme, l'utilisation de ce modèle animal a permis l'étude de cet agent infectieux et le séquençage de son génome en 1989.

b. L'hépatite C aujourd'hui

Le VHC est un problème de santé publique. Dans le monde, environ 200 millions de personnes sont infectées. L'infection par ce virus est caractérisée par un taux élevé de chronicité, en effet 80% des patients infectés développent une hépatite C chronique. L'évolution silencieuse de la maladie et la fréquence élevée de passage à la chronicité expliquent l'existence d'un grand réservoir de sujets infectés. L'infection chronique par le VHC est associée au développement de graves pathologies hépatiques telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). C'est à l'heure actuelle la première cause de transplantation hépatique aux États-Unis.

Il n'existe pas de vaccin contre l'hépatite C mais un traitement anti-viral associant l'interféron α et la ribavirine est efficace pour la moitié des patients environ (Ghany et al., 2009), en conséquence, le nombre de patients développant un CHC suite à une infection chronique par le VHC risque d'augmenter dans les années à venir (Williams, 2006). Cependant, les progrès scientifiques ont débouché sur la mise au point de nouveaux antiviraux contre l'hépatite C. Deux nouveaux agents thérapeutiques ciblant la protéase virale, le télaprevir et le boceprévir, ont été récemment homologués dans certains pays comme la France (Poordad and Dieterich, 2012; Sarrazin et al., 2012). Ces molécules sont administrées en trithérapie avec l'interféron α et la ribavirine. D'autres inhibiteurs de la réplication virale sont en cours de développement, les principales cibles sont la protéase et la polymérase virales (Poordad and Dieterich, 2012; Varshney et al., 2012; Welsch et al., 2012).

c. Variabilité génétique du VHC

Le VHC appartient à la famille des *Flaviridae* (Choo et al., 1989). Cette famille de virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive comprend notamment les virus de la dengue et de la fièvre jaune. Le VHC forme à lui seul le genre *Hepacivirus* (Robertson et al., 1998). Le VHC est caractérisé par une grande variabilité génétique. L'analyse phylogénique des souches du virus, isolées dans différentes régions du monde, a permis de définir six génotypes majeurs, numérotés de 1 à 6 qui diffèrent de 30 à 35% dans leur séquence nucléotidique. Au sein d'un génotype, il peut exister un grand nombre de «sous-types» qui diffèrent de 20 à 25% dans leur séquence nucléotidique (Simmonds et al., 2005). Les pressions de sélection exercées par l'ensemble des réponses antivirales chez un individu infecté sont à l'origine de la distribution en « quasi-espèces » du virus. Le VHC circule chez chaque patient infecté sous la forme d'une quasi-espèce virale, c'est-à-dire d'un mélange complexe en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts mais apparentés, car

tous dérivés du même inoculum. Ce mécanisme permet au virus de s'adapter à l'environnement dans lequel il évolue et joue un rôle crucial dans la persistance de l'infection virale.

d. Les formes circulantes du VHC

Les analyses sur gradients de densité du VHC démontrent que plusieurs formes du virus coexistent dans le plasma de patients chroniquement infectés. La présence d'ARN viral est détectée dans des fractions de densité allant de moins de 1,06 g/mL à plus de 1,3 g/mL. La faible densité de certaines particules virales circulantes s'explique par leur association à des des lipoprotéines (Thomssen et al., 1993, 1992). Ces particules hybrides ont été dénommées lipo-viro-particules (LVP) et associent des composants viraux (nucléocapside, protéines d'enveloppe, ARN viral) et des composants lipidiques et protéiques caractéristiques des lipoprotéines (André et al., 2002). L'analyse de la composition des LVP a mis en évidence des particules proches des very-low-density-lipoprotéines (VLDL) (Diaz et al., 2006). Les LVP ont été détectées chez la quasi-totalité des patients chroniquement infectés, représentant en moyenne 40% des virions circulants, avec de fortes variations selon les patients (André et al., 2002). La comparaison de l'infectiosité des différentes particules virales a révélé que les particules les plus infectieuses sont celles ayant une faible densité (Hijikata et al., 1993). Ces formes de LVP circulantes permettent au virus d'échapper à la neutralisation par les anticorps puisque qu'elles sont internalisées par le récepteur des lipoprotéines (LDL-receptor) (André et al., 2002), bien qu'elles soient couvertes d'anticorps du patient reconnaissant notamment les protéines d'enveloppe virale (Scholtes et al., 2012).

e. Le cycle viral

Le VHC se répliquant très mal en culture, son cycle de réplication dans les cellules est encore mal connu. En effet, seule la souche JFH1 isolée d'un patient atteint d'une hépatite C fulminante, se réplique efficacement dans une lignée d'hépatome humain Huh7.5. Pour entrer dans les hépatocytes, les particules virales se lient à la cellule hôte par des interactions spécifiques avec de multiples récepteurs de surface parmi lesquels le LDL-récepteur, CD81 ou encore SR-B1. Les complexes récepteur-particule sont ensuite transloqués aux jonctions serrées au niveau desquelles les corécepteurs claudine-1 et occludine facilitent l'endocytose clathrine dépendante. Suite à l'acidification de l'endosome, les protéines d'enveloppe permettent la fusion des membranes cellulaires et virales libérant alors le génome viral dans le cytoplasme (Joyce and Tyrrell, 2010). Le génome viral est ensuite traduit au niveau du réticulum endoplasmique en une polyprotéine qui sera clivée par des protéases cellulaires et virales. Les complexes de réplication se forment au niveau du « membranous web », une altération de la membrane du réticulum endoplasmique induite par le virus, sous forme de vésicule permettant de concentrer l'ensemble des facteurs viraux et cellulaires nécessaires à la réplication (Joyce and Tyrrell, 2010). Enfin, les néo-particules s'assemblent dans la lumière du réticulum endoplasmique en association avec les VLDL avant d'être sécrétées dans le milieu extracellulaire (Icard et al., 2009).

2. Les protéines

Le génome du VHC est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Il comprend deux régions terminales non traduites en 5' et 3' (UTR) et un cadre ouvert de lecture (ORF) codant une polyprotéine qui est ensuite clivée en dix protéines virales distinctes (fig. 1) : les protéines structurales (protéine de capside Core, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), p7 et les protéines non structurales (NS) (Pawlotsky, 2002;

Rehermann, 2009). Ces protéines possèdent de nombreuses fonctions et propriétés, dont certaines sont indispensables à la production des particules virales. D'autres semblent jouer un rôle dans la pathogénie de l'hépatite C. La structure du virus, les interactions entre les protéines virales et les cellules de l'hôte, et les fonctions des protéines virales sont largement revues dans des articles de synthèse (Dubuisson, 2007; Moradpour et al., 2007)

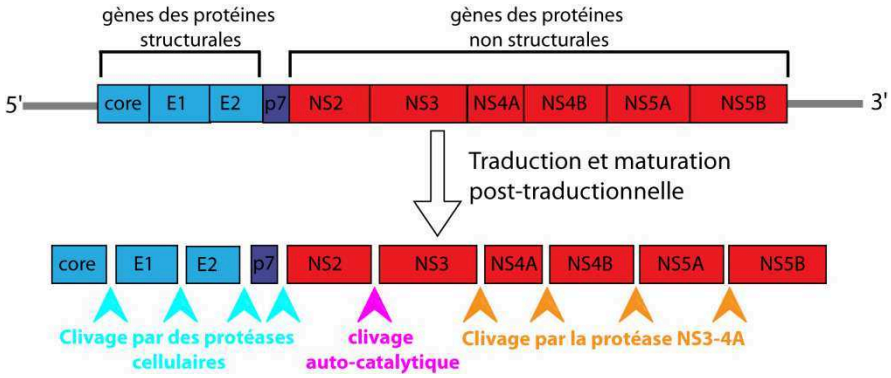


Figure 1 : Structure du génome du VHC. Il s'agit d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9,6 kb qui comprend une région 5' non codante, un cadre de lecture ouvert et une région 3' non codante. La traduction du cadre de lecture ouvert et sa maturation post-traductionnelle conduit à la libération des protéines virales structurales, de p7 et des protéines non structurales. Les clivages Core/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 sont effectués par des protéases cellulaires. La jonction NS2/NS3 est clivée par l'action auto-catalytique de la protéase NS2-NS3, constituée par la partie C-terminale de NS2 et la partie N-terminale de NS3. La sérine protéase NS3 associée à son co-facteur NS4A assure quant à elle le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval : NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B.

a. Les protéines structurales

- Core (protéine de capside)

Il s'agit d'une phosphoprotéine très basique de 21kDa, qui comporte un segment hydrophobe à son extrémité C-terminale et reste localisée à la membrane du réticulum endoplasmique face cytoplasmique. Sa séquence est très conservée d'une souche virale à l'autre. Elle interagit avec l'ARN et permet la formation de la nucléocapside. Son interaction avec les régions UTR de l'ARN viral suggère une implication dans le contrôle de la réplication virale et de la traduction. En plus de cette fonction structurale, la protéine Core peut moduler plusieurs processus cellulaires impliqués dans la pathogenèse virale en interagissant directement avec les protéines cellulaires : apoptose, formation des gouttelettes

lipidiques et perturbation du métabolisme lipidique, formation des ROS (Reactive Oxygen Species), voies de signalisation, activation transcriptionnelle modifiant l'expression de certains gènes (Battaglia et al., 2009; Moriya et al., 1998; Pavio et al., 2005; Piodi et al., 2008; Ray et al., 1996; Sabile et al., 1999).

- Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles possèdent un ectodomaine N-terminal et une région hydrophobe C-terminale d'ancrage dans le réticulum endoplasmique. E1 et E2 s'associent et forment des complexes non covalents constituant la structure de base de l'enveloppe virale permettant l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires et probablement la fusion des membranes cellulaires et virales lors de l'entrée du virus dans les cellules cibles. L'interaction de E2 avec CD81 inhibe *in vitro* l'activation des lymphocytes T (LT) et des cellules NK (natural killer) (Crotta et al., 2002; Tseng and Klimpel, 2002). E2 peut également inhiber *in vitro* la protéine kinase R (PKR), interférant ainsi avec la réponse interféron (IFN) (Taylor et al., 1999), ce qui pourrait favoriser la persistance de l'infection par le VHC.

- Le polypeptide p7

Il s'agit d'un polypeptide de 63 acides aminés intercalé entre les protéines structurales et non structurales. Il possède 2 segments transmembranaires et ses extrémités C-terminale et N-terminale sont orientées vers la lumière du réticulum endoplasmique. Ce polypeptide peut s'arranger en polymère afin de former un canal ionique. Il n'est pas nécessaire pour la réplication de l'ARN *in vitro* mais est essentiel pour l'infection *in vivo*. En effet, en augmentant la perméabilité membranaire, il facilite l'assemblage et la libération des virions (Steinmann et al., 2007).

b. Les protéines non structurales

- La protéine NS2

C'est une protéine transmembranaire de 23 kDa, ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique, qui forme avec le domaine N-terminal de NS3 une métalloprotéase zinc-dépendante, responsable du clivage entre NS2 et NS3. NS2 est essentielle pour le cycle complet de réplication *in vitro* et *in vivo*. Cette protéine semble jouer un rôle important dans l'assemblage des particules virales via des interactions avec d'autres protéines du VHC (Phan et al., 2009). Il a été montré que NS2 interagit avec la protéine cellulaire CIDE-B inhibant ainsi l'apoptose induite par CIDE-B (Erdtmann et al., 2003). NS2 peut aussi réguler la transcription cellulaire en agissant sur de nombreux promoteurs (Dumoulin et al., 2003).

- Les protéines NS3 et NS4A

NS3 est une protéine bi-fonctionnelle de 70 kDa contenant un domaine serine-protéase N-terminal et un domaine NTPase/hélicase C-terminal. Il n'existe aucun argument suggérant que ces deux domaines fonctionnels puissent être séparés par clivage. Leur association pourrait être le résultat d'une interdépendance fonctionnelle.

La partie hélicase de NS3 appartient à la superfamille des hélicases 2DexH/D-box. La caractéristique de ce type d'hélicase est de déshybrider des duplex ARN-ARN sous dépendance de l'ATP. L'activité hélicase requiert la formation de dimères de NS3 qui se lient à l'ARN viral et assurent le déroulement des duplex d'ARN.

L'activité protéasique de NS3 est optimale lorsque la protéase est associée à son cofacteur NS4A. La sérine-protéase ainsi formée est notamment responsable de nombreux clivages dans la polyprotéine virale (fig. 1) et joue un rôle crucial dans la formation du complexe de réplication. NS4A est un polypeptide de 54 acides aminés qui interagit avec la

partie N-terminale de NS3. La liaison de NS4A est nécessaire afin de permettre le repliement complet de NS3 (fig. 2). De plus cette liaison induit un changement de conformation qui aboutit au repositionnement du site catalytique de la protéase (Brass et al., 2008; Kim et al., 1996). La poche du site actif de la protéase, particulièrement peu profonde, nécessite des substrats présentant une grande surface d'interactions. Cette caractéristique complique la mise au point d'inhibiteurs spécifiques de la protéase. Deux inhibiteurs de NS3-4A ont récemment été mis sur le marché en Europe et aux Etats-Unis en association avec le traitement classique (Sarrazin et al., 2012).



Figure 2 : Modèle putatif du changement de conformation induit par l'association de NS4A à NS3 et repliement final du complexe NS3-4A. La traduction de NS3 a lieu à la membrane. NS3 et NS4A non clivées s'associent à la membrane grâce à une interaction entre une hélice amphiphile de NS3 (en vert) et l'interface membranaire. NS4A est ensuite clivée induisant ainsi son changement de conformation et son association au domaine protéase de NS3 et à la membrane. Cette association va permettre le repliement final de NS3 où le domaine sérine protéase est exposé à la membrane et où le domaine NTPase/hélicase s'éloigne. D'après Brass *et al*, 2008.

La spécificité des substrats de la protéase de NS3-4A est déterminée par les séquences de clivages consensus suivantes D/E-X-X-X-X-C/T↕S/A-X-X-X. Cependant les récentes découvertes de substrats pour NS3-4A laissent supposer un scénario plus complexe. Ainsi, malgré le grand nombre de cibles présentant une séquence consensus, seul un petit nombre est effectivement clivé par NS3-4A. De plus, les substrats cellulaires identifiés pour l'instant présentent des différences avec les séquences consensus (tab. 1). La spécificité pour le substrat semble donc contrôlée par d'autres facteurs tels que le positionnement vis-à-vis du site actif de NS3-4A par rapport à la membrane (Morikawa et al., 2011).

Tableau 1 : Cibles cellulaires de la protéase NS3-4A

Cible cellulaire	Site de clivage	Conséquence du clivage	Référence
MAVS	EREVPC ↕ HRPS	Bloque la signalisation RIG-I	(Bellecave et al., 2010; Li et al., 2005b; Meylan et al., 2005)
TRIF	PSSTPC ↕ SAHL	Bloque la signalisation du récepteur toll-like 3	(Li et al., 2005a)
TC-PTP	KESVKC ↕ AQYW PAVIHC ↕ SAGI	Augmente la signalisation d'EGF et l'activité basale d'Akt	(Brenndörfer et al., 2009)

Comme indiqué dans le tableau 1, NS3-4A clive et inactive MAVS, une protéine clé de la voie d'induction de l'IFNβ. La protéase cible aussi TRIF un adaptateur clé de la voie de signalisation du récepteur toll-like 3, aboutissant à la synthèse d'IFN. De plus NS3-4A clive TC-PTP modulant ainsi la voie de signalisation de EGF. NS3-4A joue donc un rôle crucial dans la suppression de la réponse antivirale cellulaire induite par le VHC.

Le domaine N-terminal de NS3 pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse, en interagissant avec la protéine p53 suppresseur de tumeur, inhibant ainsi sa liaison à l'ADN et bloquant l'activité transcriptionnelle p53-dépendante qui en résulte (Deng et al., 2006). De plus une inhibition de l'activité du promoteur de p21/WAF1, par NS3 a également été décrite (Kwun et al., 2001). La protéine p21/WAF1 inhibe le cycle cellulaire (Xiong et al., 1993).

- La protéine NS4B

NS4B est une petite protéine hydrophobe de 27 kDa, intégralement transmembranaire, et localisée dans la paroi du réticulum endoplasmique où elle est orientée vers le cytoplasme. Elle est associée aux autres protéines non structurales au sein du complexe de réplication. Une des fonctions de cette protéine est de participer à l'induction d'un compartiment membranaire spécialisé appelé « membranous web » qui correspond au site de réplication de l'ARN viral et de maturation de la polyprotéine.

- La protéine NS5A

Il s'agit d'une protéine relativement hydrophobe qui existe sous deux formes distinctes, de masses moléculaires respectives 56kDa et 58kDa et qui se différencie par leur degré de phosphorylation. Dans son état basal, elle interviendrait dans le processus de réplication de l'ARN viral en se liant aux extrémités 3' des ARN viraux positifs ou négatifs, alors que la forme hyperphosphorylée serait davantage impliquée dans l'assemblage des virions. Son interaction avec NS5B serait nécessaire à la réplication. NS5A a aussi été décrit pour interagir avec de nombreuses protéines cellulaires perturbant ainsi plusieurs voies de signalisation telles que la voie de l'interféron, la voie des MAPK et de PI3K, la voie du transforming growth factor β (TGFβ) (Choi and Hwang, 2006; Macdonald and Harris, 2004). Il a récemment été mis en évidence que NS5A pouvait induire la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (Akkari et al., 2012).

- La protéine NS5B

NS5B (68kDa) est une ARN-polymérase ARN-dépendante, enzyme clé de la réplication du génome viral puisqu'elle assure la synthèse des deux brins complémentaires. Le brin négatif complémentaire, intermédiaire de réplication, sert ensuite de matrice à la synthèse de grandes quantités d'ARN positif. NS5B est une cible majeure pour les traitements antiviraux. L'activité enzymatique de NS5B peut être modulée par d'autres protéines virales (NS3 et NS5A).

- La protéine F

Une onzième protéine "F" (frameshift protein) a été décrite. Elle est générée par un changement de cadre de lecture du ribosome dans la région N-terminale de l'ORF codant la protéine Core. Sa fonction au cours du cycle viral reste indéterminée. Il semblerait que la

protéine F puisse jouer un rôle dans la transformation des hépatocytes dans le CHC (Wu et al., 2007).

c. L'interactome homme/VHC

- Approche systématique de la biologie

Pendant longtemps la recherche fondamentale a privilégié l'étude d'un organisme en étudiant individuellement ses composants. Or une fonction biologique ne peut être attribuée à une seule molécule mais résulte plutôt de multiples interactions entre molécules (ADN, ARN, protéines, lipides, polysaccharides…). La biologie des systèmes repose sur le principe que le comportement d'un système complexe (organisme) ne peut être uniquement prédit par la connaissance détaillée de ses éléments. En effet les interactions entre les éléments du système sont à l'origine de propriétés dite émergentes qui ne peuvent être prédites par la simple connaissance de chaque élément. Les protéines sont des acteurs des processus biologiques et l'étude des réseaux d'interactions protéine-protéine est au cœur même de la compréhension de l'organisation fonctionnelle d'une cellule.

Lors d'une infection virale le réseau protéique humain (interactome) va être perturbé, de nouvelles contraintes vont apparaître. Le virus détourne les fonctions cellulaires à son profit, ce qui perturbe le fonctionnement de la cellule et peut conduire au développement de pathologies. Ainsi, le laboratoire a entrepris l'étude de l'interactome homme/VHC afin de mieux comprendre les perturbations de l'hôte cellulaire par le VHC et de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles (De Chassey et al., 2008).

- L'interactome homme/VHC

Un crible haut-débit, en double hybride chez la levure, des interactions entre les 11 protéines virales du VHC et les protéines humaines a été entrepris au laboratoire. Ce crible a permis de mettre en évidence 314 nouvelles interactions. Avec les interactions connues de la littérature, 484 interactions ont été identifiées entre les protéines du VHC et 421 protéines humaines (fig. 3). Les protéines virales les plus connectées sont NS3, NS5A et core. L'analyse de ce réseau a permis de mettre en évidence que le VHC touche préférentiellement les voies de l'insuline, JAK-STAT et du TGFβ, ce qui est cohérent avec les syndromes observés chez les patients chroniquement infectés par le VHC. Cette analyse a aussi permis l'identification pour la première fois du ciblage de la voie des adhésions focales par le VHC et plus particulièrement par les protéines NS3 et NS5A. Les adhésions focales sont des structures spécialisées au point de contact avec la matrice extracellulaire qui jouent des rôles majeurs dans des processus biologiques tels que la mobilité, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Cette voie pourrait être impliquée dans le développement du CHC.

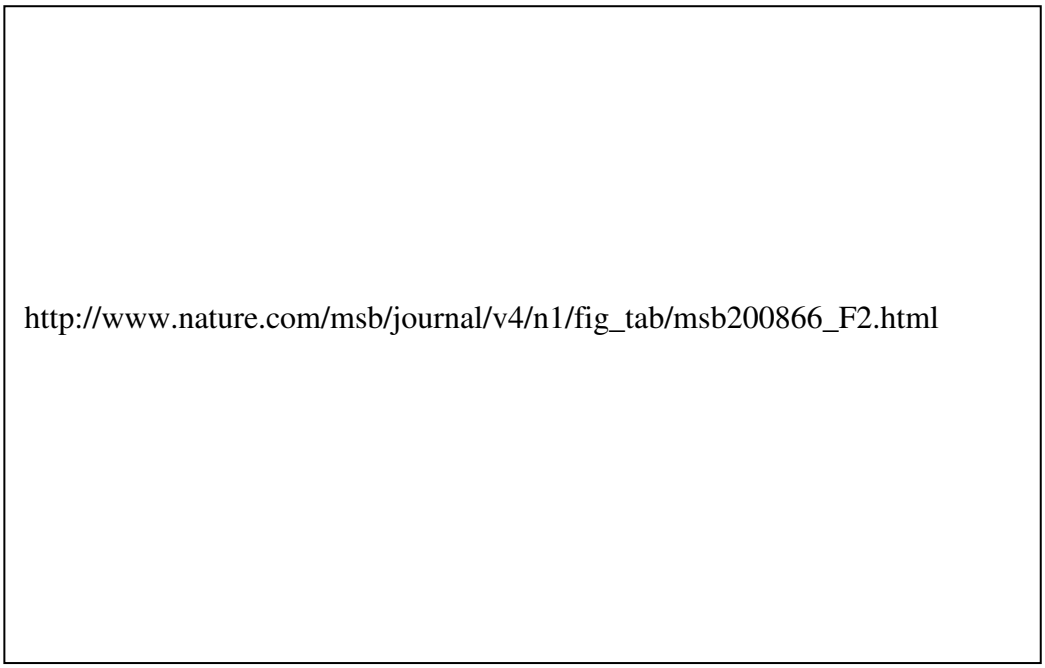


Figure 3 : Interactome homme/VHC. H_{HCV} : protéine humaine ciblée par au moins une protéine virale, H_{HCV}-H_{HCV} : interaction entre 2 protéines humaines ciblées par le VHC, V-H_{HCV} : interaction entre une protéine virale et une protéine humaine. D'après de Chassey et al, 2008.

La base de données publique VirHostNet a été créée au laboratoire (Navratil et al., 2009). Cette base intègre les données d'interactions hôte-hôte, virus-virus, et virus-hôte ainsi que leurs annotations fonctionnelles. Pour cela les données d'interactions des grandes bases de données publiques ont été intégrées puis toutes les interactions protéiques virus-virus et virus-hôte ont été vérifiées manuellement au laboratoire par une analyse détaillée de la littérature. Au total 524 protéines virales différentes sont représentées dans VirHostNet. Malgré toutes les avancées réalisées ces dernières années l'interactome humain est encore loin d'être complet. Dans la base de données VirHostNet actuellement disponible au laboratoire l'interactome humain compte actuellement 72 357 interactions alors qu'il a été estimé à 650 000 (Stumpf et al., 2008).

3. Histoire naturelle de l'infection par le VHC

L'hépatite C est une maladie d'évolution chronique (fig. 4). La majorité des personnes infectées développe une forme persistante d'infection sur plusieurs dizaines d'années (Chen and Morgan, 2006). La diversité des facteurs influençant l'histoire naturelle de l'infection par VHC empêche de décrire précisément le devenir d'une population de malades contaminés par le VHC.

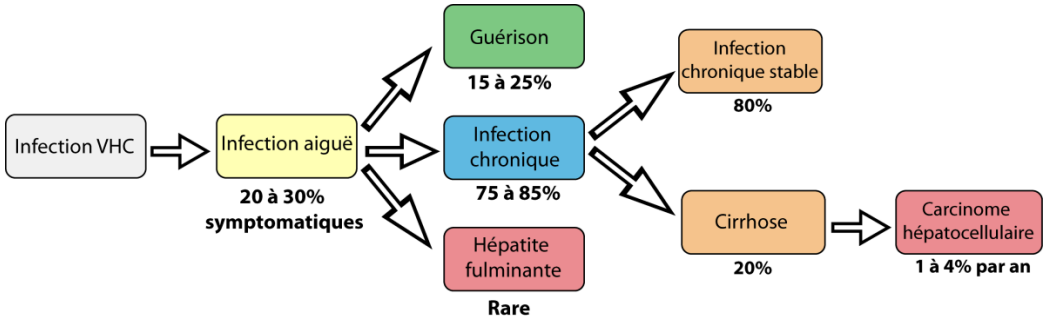


Figure 4 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC

L'infection aiguë est généralement asymptomatique. 15 à 25% des patients développent une réponse immunitaire efficace permettant l'élimination du virus. Cependant dans la plupart des cas, la réponse immune est inefficace conduisant dans environ 80% des cas à une infection chronique. Le passage à la chronicité est influencé par de nombreux facteurs. Il est plus élevé chez les sujets âgés (Alter et al., 1999; Bellentani and Tiribelli, 2001), masculins (Wiese et al., 2000), porteurs d'un déficit immunitaire (co-infection VIH, (Thomas et al., 2000)).

a. L'hépatite C chronique

Une infection par le VHC est considérée comme chronique quand l'ARN du VHC persiste dans le sang plus de 6 mois après l'infection. Les patients vont alors développer des lésions histologiques d'hépatite chronique. 20% des patients atteints chroniquement par le VHC présenteront une évolution clinique grave avec une progression des lésions hépatiques en cirrhose, stade ultime de la maladie fibrosante voire en CHC (fig. 4). La progression vers la cirrhose est souvent cliniquement silencieuse pendant des dizaines d'années. Ainsi, certains patients ne sont détectés que lorqu'ils présentent des complications sérieuses.

L'infection chronique par le VHC perturbe les métabolismes des lipides et du glucose. L'hépatite C est associée à un syndrome métabolique caractérisé par une stéatose hépatique avec dans certains cas une résistance périphérique à l'insuline (Petit et al., 2003). Les études cliniques ont révélé que l'infection par le VHC était fortement associée à l'insulino-résistance et au diabète de type 2 (Mehta et al., 2003). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette insulino-résistance associée à l'infection chronique par le VHC comme l'augmentation de la sécrétion TNFα, la modulation de phosphorylation d'Akt, ou encore l'augmentation d'expression des gènes de la néo-glucogenèse (Parvaiz et al., 2011).

b. Fibrose et Cirrhose

- Description

La fibrose du foie est une conséquence de l'inflammation chronique. Elle est caractérisée par des changements de l'organisation de la MEC au sein du tissu hépatique. Un dépôt anarchique des composants de la MEC ainsi qu'une augmentation quantitative et une modification qualitative de la MEC conduisent à la formation d'une MEC réticulée et résistante à la dégradation enzymatique caractéristique de la fibrose. Le stade ultime de la maladie fibrosante est la cirrhose.

- Epidémiologie et facteurs aggravants

Le taux de progression vers la fibrose varie fortement selon les patients. La fibrose est influencée par de très nombreux facteurs externes et dépendants de l'hôte, qui peuvent accélérer la vitesse de progression de la fibrose vers la cirrhose. Les facteurs favorisant le développement de la fibrose sont davantage liés à l'hôte et aux facteurs environnementaux (âge élevé au moment de la contamination, sexe masculin, consommation d'alcool (> 30g/j), obésité et insulino-résistance, co-infection par les virus VHB et VIH, immunodépression, stéatose) qu'au virus (Chen and Morgan, 2006; Massard et al., 2006).

La cirrhose est le stade final de la fibrose hépatique et certains patients n'atteignent jamais ce stade. Récemment, des études génétiques ont mis en évidence chez l'hôte des polymorphismes génétiques susceptibles d'influencer l'évolution de la fibrose (Romero-Gomez et al., 2011). Par exemple le polymorphisme de TGFβ1 est associé à une fibrose au développement plus rapide et à un risque de développement plus important de cirrhose (Falleti et al., 2008; Gewaltig et al., 2002). Une des complications finales de l'infection par le VHC est la cirrhose décompensée. Elle est caractérisée par l'apparition de complications telles que

le développement d'hémorragie digestive, d'ascite, d'hypertension portale et d'encéphalopathie hépatique (Chen and Morgan, 2006).

- Implication des protéines virales

L'infection chronique par le VHC induit des lésions et des inflammations responsables du développement de la fibrose. Cependant la sévérité et la progression de la fibrose ne seraient pas uniquement dues à l'exposition prolongée au virus. Plusieurs protéines virales semblent jouer un rôle dans le développement de la fibrose et de la cirrhose, plus particulièrement les protéines Core, NS3 et NS5A.

Il a été récemment mis en évidence que chez des souris exprimant toutes les protéines virales, l'induction de la fibrose par un agent extérieur (CCl4) est plus rapide et sévère (Chouteau et al., 2012). Dans ce modèle les souris expriment l'ensemble des protéines virales mais il n'y a pas de cycle réplicatif. Ce modèle a montré que l'expression seule des protéines virales n'était pas suffisante à l'induction de fibrose, suggérant ainsi que le contexte inflammatoire induit par la réplication virale est crucial dans le développement de la fibrose.

L'augmentation de fibrose induite par l'expression des protéines virales est notamment due à l'augmentation de la production de ROS qui peut être induite par plusieurs protéines virales : Core (Moriya et al., 2001), NS3-4A (Miura et al., 2008) et NS5A (Gong et al., 2001). L'augmentation de ROS a notamment pour conséquence d'induire l'expression de TGFβ (Presser et al., 2011). Le TGFβ est une cytokine dont le rôle crucial dans le développement de la fibrose est détaillé dans le paragraphe III.2.

Les protéines virales NS5A, NS3 et Core semblent aussi jouer un rôle dans l'apoptose des hépatocytes, une des premières causes de lésion dans le foie et donc de la fibrose lors de l'infection par le VHC (Schuppan et al., 2003). La protéine Core favorise également l'expression des métallo-protéases matricielles (MMP) 2 et 9 (Núñez et al., 2004), des

protéines clés de la MEC dont l'augmentation d'expression est associée à la fibrogenèse (Han, 2006).

Les perturbations du métabolisme des lipides participent aussi au développement de la fibrose, notamment en induisant la stéatose du foie. La stéatose hépatocellulaire ou « foie gras » est définie comme l'accumulation de gouttelettes lipidiques, principalement de triglycérides, dans les hépatocytes, c'est un facteur aggravant de la fibrose hépatique. Les protéines Core et NS5A participent au développement de la stéatose du foie. Ces protéines peuvent augmenter l'accumulation lipidique à l'intérieur de la cellule via leurs interactions avec les apolipoprotéines A1 et A2, induisant ainsi des défauts de synthèse et de transport des VLDL (Shi et al., 2002).

c. Carcinome hépatocellulaire

- Epidémiologie

Le cancer du foie est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de décès par cancer. Le taux de survie à un an est inférieur à 50% aux Etats-Unis. Le développement du CHC est généralement asymptomatique. Le diagnostic est donc fait tardivement, expliquant en partie le faible taux de survie associé à ce cancer. Dans la majorité des cas (80 à 90%), le CHC se développe sur une cirrhose du foie (But et al., 2008). Lorsque la cirrhose est établie, le risque de développer un CHC varie de 1 à 4% par an.

Le CHC est une tumeur hétérogène d'étiologies variées. L'hépatocarcinogenèse est un processus multi-étapes complexe se développant, dans la majorité des cas, après des décennies d'hépatopathie chronique, induisant l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques (en faisant intervenir des mécanismes multiples tels que l'activation d'oncogènes et/ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, l'activation de télomérase, l'activation des voies de signalisation de la prolifération cellulaire ou l'expression

de facteurs de croissance ou de facteurs angiogéniques) et aboutissant à la transformation maligne d'un hépatocyte (Tsai and Chung, 2010).

Dans 80% des cas le développement de CHC est associé à une infection par le VHB ou le VHC. Les patients infectés par le VHC ont 17 fois plus de risques de développer un CHC que les patients non infectés (Chen and Morgan, 2006). Plusieurs facteurs peuvent influencer le développement du CHC chez les patients chroniquement infectés par le VHC: la virémie, une co-infection VIH ou VHB, ou des facteurs génétiques tels que des polymorphismes de TNFα (facteur nécrosant de tumeur α) (El-Serag, 2012). Le génotype du VHC est un facteur à risque controversé. Il semblerait cependant qu'à une infection par le génotype 1b du VHC soit associé un risque plus important de développer un CHC (El-Serag, 2012; Ishiguro et al., 2011). Les hypothèses actuelles indiquent que le VHC induit le CHC par des voies indirectes : inflammation chronique, mort cellulaire, prolifération, cirrhose, induction de ROS, transformation maligne des hépatocytes. Cependant certaines protéines du VHC jouent aussi un rôle dans l'induction du CHC (McGivern and Lemon, 2011).

- Mécanismes d'implications des protéines virales

Comme décrit dans le paragraphe I.3.b, les protéines du VHC jouent un rôle dans le développement de la fibrose et de la cirrhose. Le développement de la fibrose étant une étape clé dans le développement du CHC, toutes ces perturbations sont aussi importantes pour la carcinogenèse. De plus l'accumulation de protéines virales dans la cellule entraine un stress cellulaire qui favorise le développement d'altérations génétiques et l'accumulation de dommages dans l'ADN prédisposant les cellules à la mutagenèse. La figure 5 présente un récapitulatif des mécanismes conduisant au développement du CHC (Tsai and Chung, 2010).

La **protéine Core** est considérée comme une onco-protéine pour plusieurs raisons. Core se lie à des protéines suppresseurs de tumeurs, telles que p53, p73 et pRb, jouant ainsi un rôle

dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par ces protéines (Tran, 2008; Tsai and Chung, 2010). Core module aussi l'expression de la protéine WNT1 favorisant de cette façon la croissance cellulaire (Tsai and Chung, 2010). Comme indiqué dans le paragraphe I.3.b, la protéine Core cible la voie de signalisation du TGFβ. Une des conséquences de ce ciblage est l'induction d'EMT, un mécanisme crucial lors de la carcinogenèse du foie comme décrit dans le paragraphe d'introduction III.3.c et d (Battaglia et al., 2009).

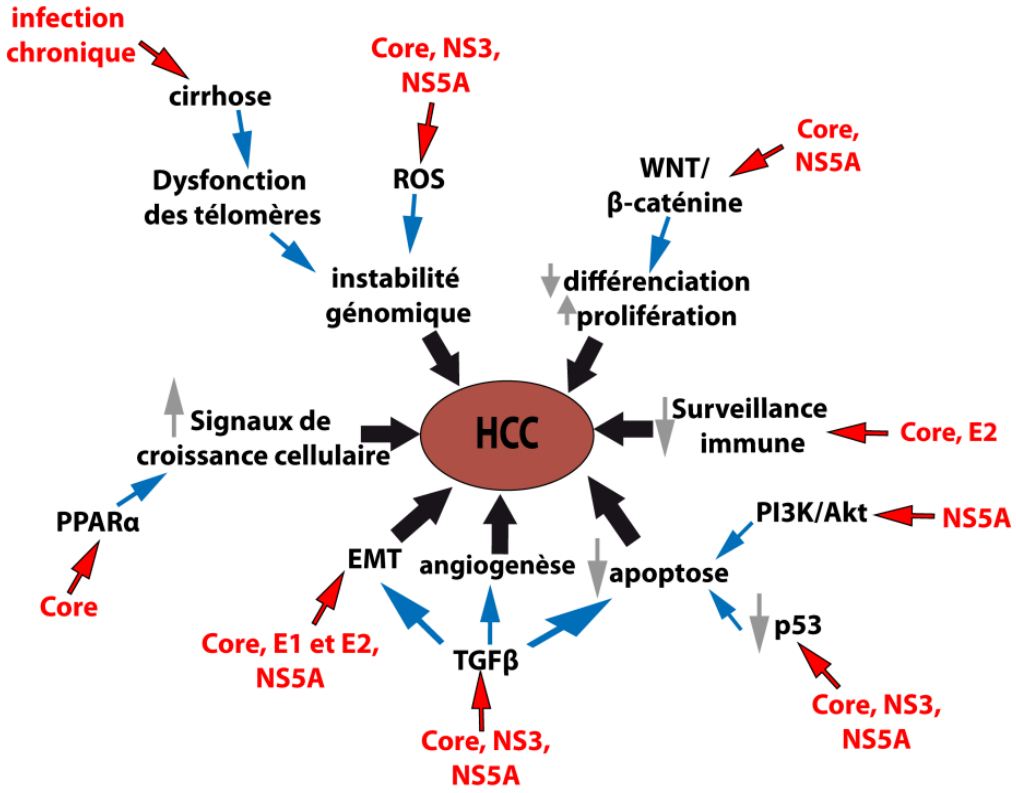


Figure 5 : Mécanismes d'induction du CHC. Adapté de Tsai and Chung, 2010 [77]. Plusieurs mécanismes vont contribuer au développement du CHC. Les protéines virales Core, NS3 et NS5A vont jouer un rôle particulièrement important dans la carcinogenèse.

Les **protéines d'enveloppe E1 et E2** pourraient aussi jouer un rôle dans le développement du CHC. Il a été montré que la protéine E2 pouvait induire la voie des MAPK/ERK, favorisant ainsi la survie et la croissance cellulaires (Tsai and Chung, 2010). De plus une étude récente a mis en évidence l'implication de E1 et E2 dans l'induction d'EMT

par le TGFβ dans les hépatocytes (Wilson et al., 2012) (décrit plus en détail dans le paragraphe III.3.d).

En plus de son rôle dans la perturbation de la réponse immunitaire, la **protéine NS3** inhibe l'activité de p21/WAF et de p53, jouant ainsi un rôle dans l'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de ces protéines (Cheng et al., 2004; Tsai and Chung, 2010). De plus NS3 interfère avec plusieurs voies de signalisation telles que la voie JNK, la voie de TNFα ou la voie du TGFβ (Cheng et al., 2004; Tsai and Chung, 2010).

La **protéine NS5A** est aussi considérée comme une onco-protéine. Comme NS3, elle inhibe l'activité de p21/WAF et de p53 (Tsai and Chung, 2010). De plus NS5A inhibe l'apoptose par plusieurs mécanismes : elle interagit avec la protéine Bax, une protéine pro-apoptotique (Tsai and Chung, 2010) et elle interagit avec le récepteur du TGFβ, une cytokine pro-apoptotique (Choi and Hwang, 2006). Enfin, une étude récente a mis en évidence que l'expression de NS5A dans les hépatocytes induisait l'EMT (Akkari et al., 2012) (décrit plus en détail dans le paragraphe III.3.d).

II. La voie de signalisation du TGFβ

1. Généralités

a. Les différents ligands

La super-famille du TGFβ comprend environ 35 cytokines appartenant à de nombreuses familles de protéines telles que les BMP, Nodal… Les membres de la famille du TGFβ sont exprimés dans la majorité des cellules et sont caractérisés par la présence de six cystéines conservées (Shi and Massagué, 2003). Ces cytokines jouent des rôles cruciaux dans le développement et dans l'homéostasie tissulaire. Les dérégulations des voies de signalisation de ces protéines sont associées à de nombreux troubles du développement et à diverses maladies comme le cancer, la fibrose ou encore les maladies auto-immunes (Horbelt et al., 2012). Un ligand de la famille du TGFβ se lie sur des récepteurs dimériques de type I et II à activité sérine/thréonine kinase induisant ainsi la formation de complexe tétramérique (fig. 6). Cette liaison va induire une signalisation par l'activation des protéines Smad par phosphorylation. Il existe huit protéines Smad différentes : les Smad se liant aux récepteurs ou R-Smad (Smad1, 2, 3, 5 et 8), Smad4 et les Smad inhibitrices ou I-Smad (Smad6 et 7). Une des premières régulations de la réponse induite par ces cytokines vient des récepteurs sur lesquels ces cytokines se lient ainsi que des protéines R-Smad activées (fig. 6) (Shi and

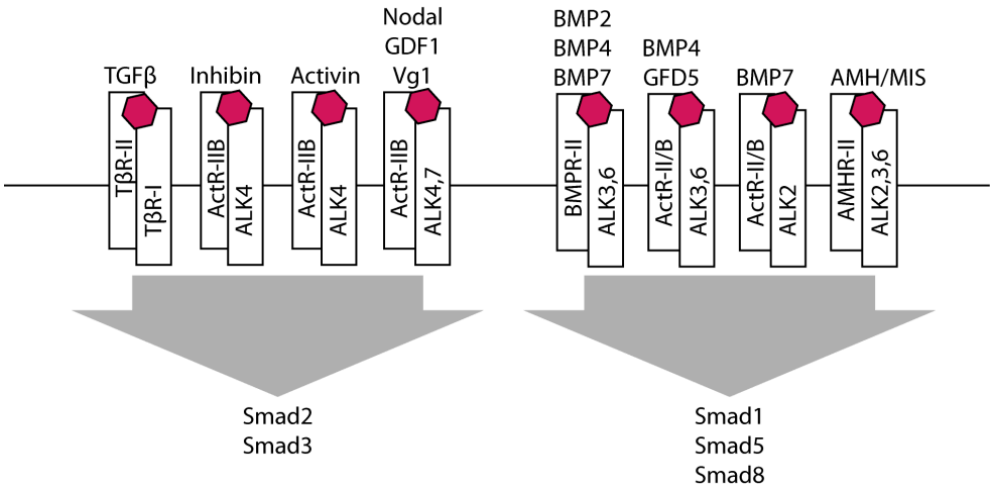


Figure 6 : Relation entre les cytokines de la famille du TGFβ, les récepteurs et les protéines Smad (adapté de Shi & Massagué, 2003).

Massagué, 2003). Un troisième récepteur, non nécessaire à l'activation de la voie de signalisation peut aussi être impliqué dans la signalisation. Ce récepteur dit de type III a diverses fonctions, il peut notamment permettre d'augmenter la spécificité pour un ligand ou de réguler la disponibilité du ligand pour les récepteurs de type I et II. Dans la signalisation du TGFβ le récepteur de type III le plus étudié est le bétaglycane (Derynck and Zhang, 2003).

La réponse au TGFβ d'une cellule est un mécanisme complexe qui résulte de différentes régulations transcriptionnelles et non transcriptionnelles dépendant du contexte et de l'environnement cellulaire (Feng and Derynck, 2005)

Nous nous focaliserons essentiellement sur la signalisation de la famille du TGFβ (TGFβ/ activin/ Nodal) activant Smad2 et Smad3 et plus particulièrement sur TGFβ1.

b. Activation et synthèse du TGFβ

Le TGFβ existe au moins sous trois isoformes TGFβ1, TGFβ2 et TGFβ3. Le TGFβ mature est un homodimère de deux polypeptides de 12,5 kDa liés par un pont disulfure Il est secrété par de nombreuses cellules sous une forme latente associée à deux autres protéines

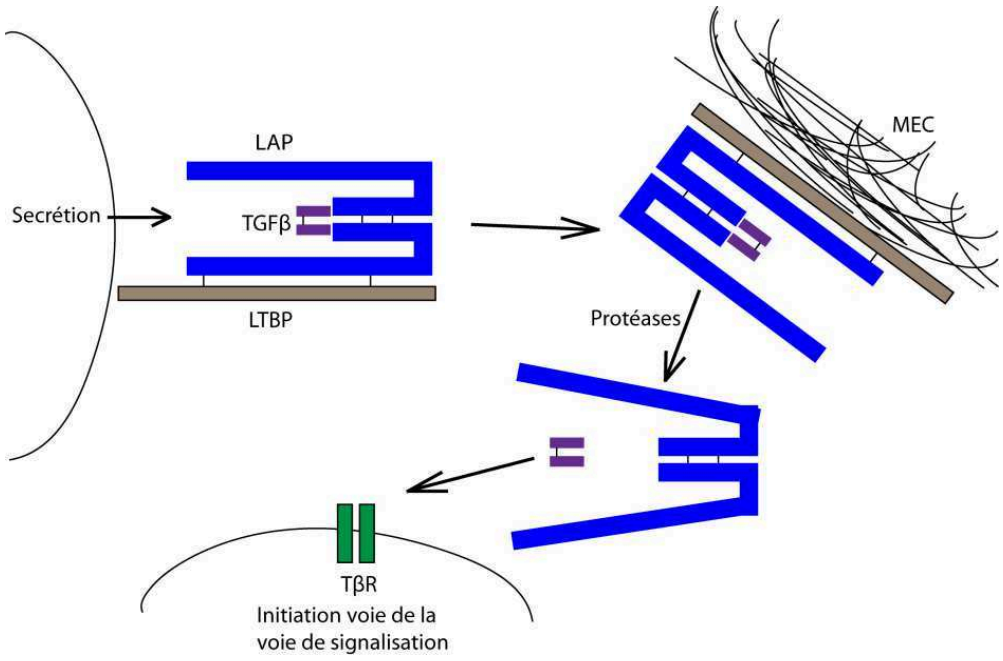


Figure 7 : Sécrétion et activation du TGFβ. Le TGFβ est sécrété sous forme latente associé à LAP et LTBP. La protéine LTBP permet l'association à la MEC. La libération du TGFβ du complexe latent se fait sous l'action de diverses protéases et permet son activation ainsi que sa liaison au TβR initiant ainsi la signalisation.

LTBP (latent TGFβ binding protein) et LAP (latency-associated peptide). Il peut aussi être sécrété uniquement associé à LAP sous la forme d'un petit complexe latent (Annes et al., 2003). Les changements de conformation de ce complexe latent sont induits soit par un clivage protéolytique des LAP par différentes protéases comme la plasmine, la thrombine, ou encore les transglutaminases, soit par des interactions physiques des LAP avec d'autres protéines, telles que la thrombospondine-1, ce qui aboutit à la libération d'une forme bioactive du TGFβ (fig. 7) (Gressner et al., 2005). L'activation des protéases est déclenchée par divers signaux comme un environnement inflammatoire (Annes et al., 2003). Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) liant le TGFβ sous sa forme latente jouent un rôle crucial dans la libération ou la séquestration du TGFβ.

2. La voie de signalisation du TGFβ dépendant des protéines Smad

a. Description de la voie de signalisation canonique du TGFβ

Le TGFβ actif exerce son action par des récepteurs à activité sérine thréonine kinase. La

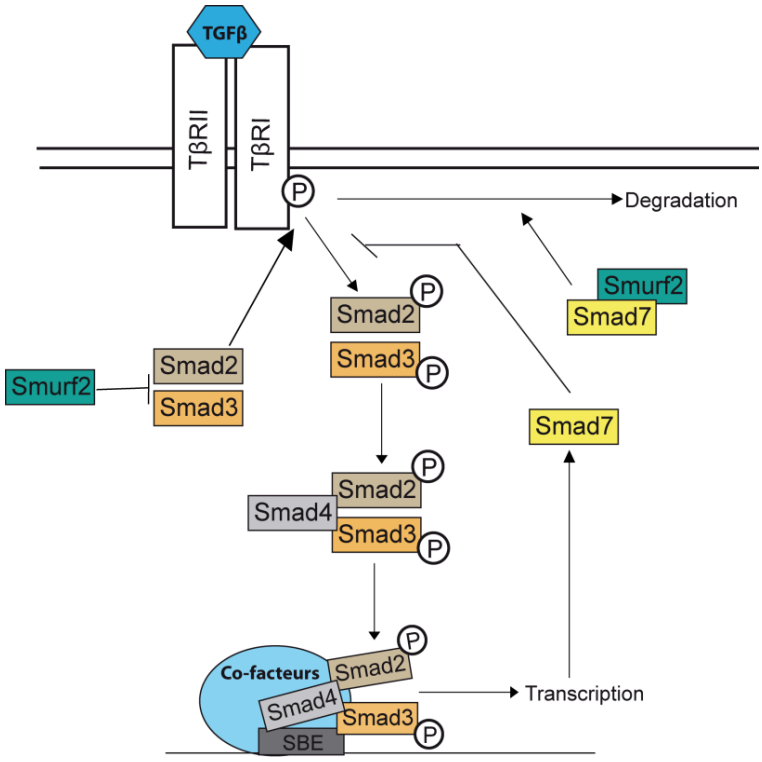


Figure 8 : Voie de signalisation du TGFβ

liaison de TGFβ à TβRII (TGFβ receptor II) induit la phosphorylation de TβRI (TGF-β receptor I) qui phosphoryle ensuite les R-Smads (Smad2/3). Les R-Smad peuvent alors recruter Smad4 formant ainsi un facteur de transcription. Le complexe est alors transloqué dans le noyau où il régule l'expression de nombreux gènes cibles comme PAI-1 ou Smad7. Cette protéine I-Smad agit à deux niveaux : en se liant directement à TβRI inhibant ainsi la phosphorylation des R-Smad et en interagissant avec Smurf1/2, des protéines E3-ubiquitine ligases.

b. Les protéines Smad

Les protéines Smad sont caractérisées par deux domaines hautement conservés au cours de l'évolution, les domaines d'homologie à Mad (MH). Les domaines MH1 et MH2 sont respectivement situés en position N- et C-terminale. Ces deux domaines sont reliés par une région intermédiaire variable riche en proline (fig. 9). TβRI phosphoryle Smad2 et Smad3 sur deux résidus sérines présents dans un motif conservé de type –SSXS- situé à l'extrémité C-terminale du domaine MH2 (Heldin and Moustakas, 2012). La phosphorylation des R-Smad par le récepteur induit des changements de conformation ce qui permet la dissociation des R-

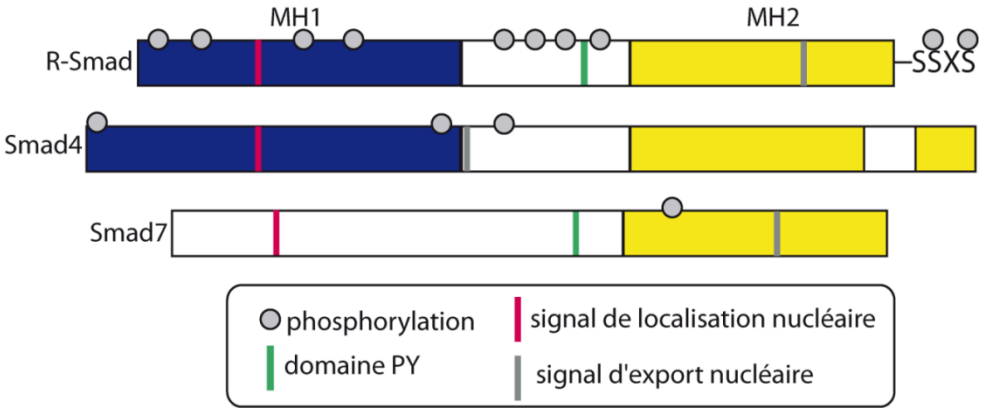


Figure 9 : Domaines et phosphorylations des protéines R-Smad, Smad4 et Smad7. Les protéines Smad sont constituées de domaines structuraux MH : MH1 en bleu, MH2 en jaune et d'une région charnière en blanc. Smad7 ne possède pas de domaine MH1, sa partie N-terminale est homologue à 30% au domaine MH1. Un domaine PY est présent dans la région charnière des R-Smad et de Smad7 permettant la liaison à Smurf1 et Smurf2. Des domaines de localisation et d'export nucléaires sont présents sur toutes ces protéines. Les phosphorylations dans le domaine MH1 régulent la liaison à l'ADN des R-Smad et Smad4 ainsi que l'ubiquitination des R-Smad. Dans la région charnière, les phosphorylations activent le recrutement des protéines à domaines WW telles que les protéines Smurf.

Smad du TβR et leur association à Smad4 (Derynck and Zhang, 2003).

Les trimères composés de deux protéines R-Smad et d'une protéine Smad4 forment ainsi un facteur de transcription qui migre dans le noyau et se lie à des éléments de réponse aux protéines Smad (SBE), régulant ainsi la transcription d'un grand nombre de gènes (Massagué and Chen, 2000). Les complexes R-Smad/Smad4 se lient à l'ADN directement ou en association avec d'autres protéines (Heldin and Moustakas, 2012). L'affinité optimale des protéines Smad3 et Smad4 est observée pour la séquence nucléotidique CAGAC, via leur domaine MH1. Une insertion de trente acides aminés dans le domaine MH1 de Smad2 empêche sa fixation directe à l'ADN. Smad7 est une protéine I-Smad qui intervient dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation (Kavsak et al., 2000). Ses fonctions sont décrites dans le paragraphe II.4.b.

c. Les gènes régulés

Comme indiqué ci-dessus le complexe R-Smad/Smad4 peut se lier à l'ADN. Le domaine MH1 de Smad3 interagit avec la séquence d'ADN 5'-CAGA-3' (SBE). Cette liaison étant de faible affinité, un enchainement de plusieurs séquences SBE est nécessaire. De plus, le complexe R-Smad/Smad4 doit s'associer à des cofacteurs cellulaires interagissant avec l'ADN pour permettre une interaction de plus haute affinité et une sélectivité par rapport aux gènes cibles. Ces protéines partenaires des Smad appartiennent à différentes familles de facteurs de transcription telles que les protéines de type forkhead, homeobox, zinc-finger, bHLH et AP1 (Feng and Derynck, 2005; Massagué et al., 2005). La juxtaposition des sites de liaisons à l'ADN de ces différentes protéines et du SBE (fig. 10) permet une régulation différentiée et spécifique des gènes cibles. Les complexes de protéines Smad recrutent également des co-activateurs et des co-répresseurs transcriptionnels ainsi que des facteurs de remodelage de la chromatine qui varient suivant le contexte cellulaire. Grâce à cet ensemble

de facteurs, un même stimulus TGFβ peut activer ou réprimer des centaines de gènes simultanément (fig. 10). Les différents facteurs s'associant au complexe R-Smad/Smad4 sont souvent dépendants du type cellulaire ce qui explique en partie la versatilité de la réponse au TGFβ.

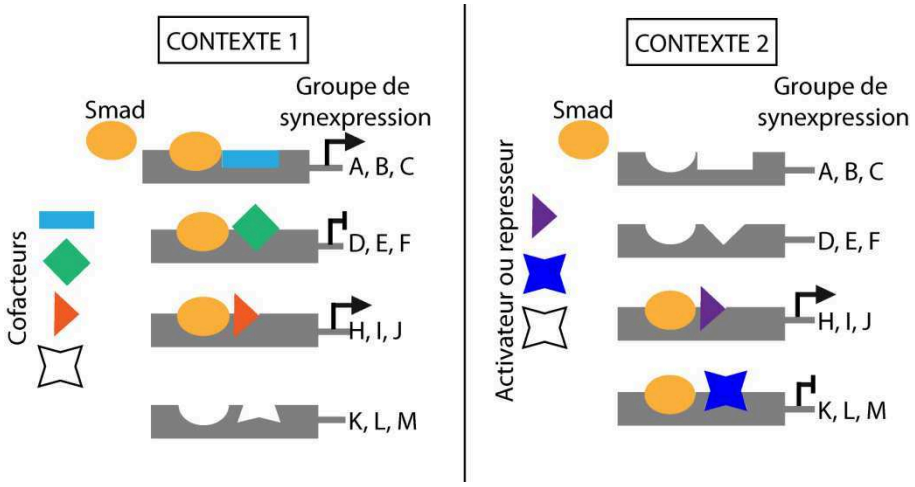


Figure 10 : Régulation de l'expression des gènes et intégration du signal. Selon le contexte (types cellulaires, facteurs environnementaux) différents facteurs et co-facteurs de transcription déterminent des ensembles de gènes activés par le facteur de transcription formé par Smad4 et les R-Smad. Les Smad jouent donc un rôle important dans la régulation du signal TGFβ (adapté de Massagué, 2008).

3. Liens entre la voie de signalisation du TGFβ et d'autres voies de signalisation

a. Activation d'autres effecteurs par le TGFβ

La liaison de la cytokine TGFβ active au complexe de TβRII/TβRI peut induire d'autres voies de signalisations indépendantes des protéines Smad, contribuant ainsi à la multiplicité de la réponse des cellules au TGFβ. Le complexe de récepteurs peut notamment activer la cascade de signalisation des protéines MAPK en induisant l'activation de JNK et de p38. Ces kinases peuvent jouer un rôle dans l'apoptose et l'EMT induites par le TGFβ (Zhang, 2009). Le TGFβ régule aussi l'activité d'Akt et l'activation d'Akt semble nécessaire pour certaines fonctions du TGFβ telles que l'induction d'EMT et la réorganisation des filaments d'actine

(Bakin et al., 2000; Zhang, 2009). Le complexe de récepteur du TGFβ active aussi des GTPase telles que RhoA et Cdc42 favorisant ainsi l'induction de fibres de stress (Derynck and Zhang, 2003). Le TβRII interagit avec Par6, une protéine d'échafaudage régulant la polarité des cellules épithéliales. Cette interaction favorise la dissociation des jonctions serrées, un pré-requis pour l'induction de l'EMT (Ozdamar et al., 2005; Zhang, 2009). Le TGFβ induit aussi la phosphorylation d'Erk par une voie dépendant de Ras, cette activation joue un rôle important dans l'induction de l'EMT par le TGFβ (Zhang, 2009). Cette liste n'est certainement pas exhaustive. En effet, une étude d'interactions à haut débit a mis en évidence plus de 100 protéines interagissant avec le complexe de TβR (Barrios-Rodiles et al., 2005), de nombreux interactants étant impliquées dans des voies de signalisation.

b. Activation des protéines Smad par d'autres protéines kinases

Les protéines R-Smad peuvent être phosphorylées par d'autres protéines kinases intracellulaires que le TβRI dans leur région charnière (fig. 9), permettant ainsi des interactions entre la voie de signalisation du TGFβ et de nombreuses autres voies de signalisation (Wrighton et al., 2009). Ces phosphorylations jouent un rôle important dans la réponse des cellules au TGFβ. Une dizaine de protéines kinases ont été identifiées pour induire des phosphorylations dans la région charnière des protéines R-Smad (Wrighton et al., 2009). Parmi ces protéines kinases on peut citer tout d'abord l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par des facteurs de croissance tels que HGF ou EGF qui conduit à l'activation de la protéine Ras et à la phosphorylation des protéine Smad, ou encore des protéines MAPK telles que JNK ou Erk phosphorylant aussi les protéines Smad (Derynck and Zhang, 2003; Feng and Derynck, 2005; Wrighton et al., 2009).

Ensuite, les protéines kinases de la famille CDK, plus particulièrement CDK2 et CDK4 (Feng and Derynck, 2005) phosphorylent aussi Smad2 et Smad3 dans leur région charnière. Ces phosphorylations inhibent l'arrêt du cycle cellulaire induit par le TGFβ.

Enfin, la protéine kinase Akt joue aussi un rôle dans la phosphorylation de Smad2 et Smad3. Les relations entre la voie PI3K/Akt et la voie du TGFβ sont nombreuses (Guo and Wang, 2009). En effet Akt interagit avec Smad3 non phosphorylé et influence sa liaison au TβRI (Feng and Derynck, 2005) inhibant ainsi l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire induits par le TGFβ (Guo and Wang, 2009).

4. Régulation de la voie de signalisation du TGFβ

De nombreux mécanismes ont été sélectionnés au cours de l'évolution afin de réguler l'activation de la voie de signalisation du TGFβ et des protéines Smad. Parmi ces mécanismes, on peut citer la localisation subcellulaire des protéines Smad et du complexe de récepteurs, le niveau d'ubiquitination et de phosphorylation des différents acteurs de la voie de signalisation et la présence de modulateurs de la réponse au TGFβ. Les mécanismes de régulation présentés ci-dessous sont détaillés dans les paragraphes suivants (fig. 11).

a. Régulation de la localisation subcellulaire des acteurs de la voie de signalisation

- Endocytose du complexe de récepteur

L'endocytose du complexe TβR est un mécanisme hautement régulé. En effet, le récepteur est internalisé principalement selon deux voies : (1) la voie d'endocytose clathrine-dépendante permettant l'activation de Smad2 et Smad3 et un recyclage du récepteur, (2) la voie d'endocytose dépendant des cavéoles, entraînant alors une endocytose dépendante de Smad7 et de Smurf2, et bloquant l'activation des R-Smad (Di Guglielmo et al., 2003). L'endocytose clathrine-dépendante du récepteur n'est pas nécessaire à la signalisation, mais la

présence de SARA (Smad anchor for receptor activation), une protéine adaptatrice pour la liaison des R-Smad au récepteur, associée à ces endosomes, favorise la signalisation (Meyer et al., 2011). Le complexe de récepteur est ensuite recyclé aux niveaux des endosomes précoces ou dégradé dans les endosomes tardifs (Chen, 2009). L'endocytose du récepteur dans les cavéoles est quant à elle associée à la présence de Smad7 et de Smurf2, et conduit à un arrêt de la signalisation associée aux protéines Smad (fig. 11) (Di Guglielmo et al., 2003).

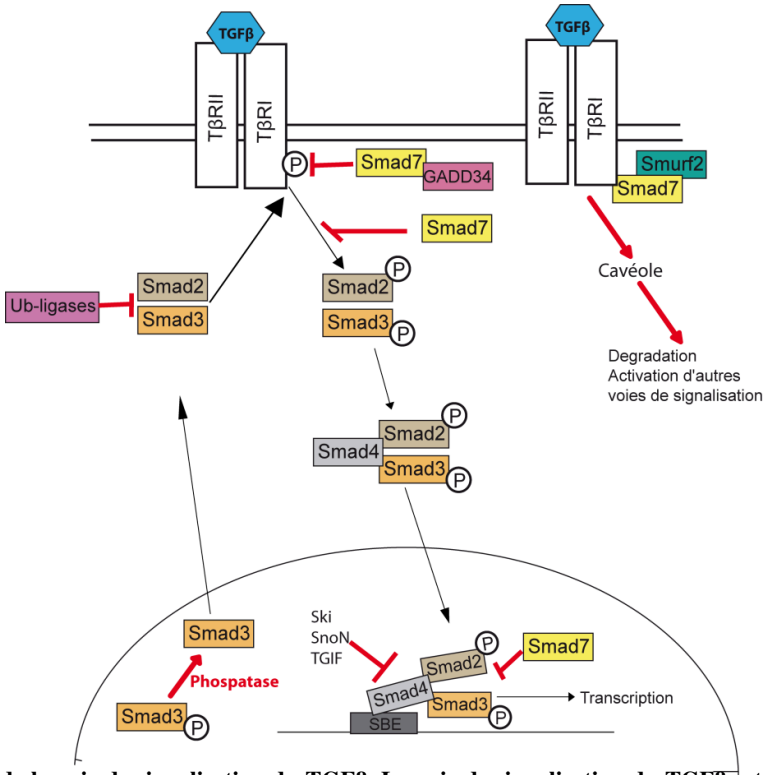


Figure 11 : Régulation de la voie de signalisation du TGFβ. La voie de signalisation du TGFβ est hautement régulée : au niveau du récepteur (dégradation par Smurf2, déphosphorylation par GADD34, inhibition de phosphorylation des R-Smad par Smad7, endocytose), au niveau des protéines Smad (degradation par des ubiquitine ligases comme Smurf2, déphosphorylation, mono-ubiquitination de Smad3) et au niveau de la liaison à l'ADN (séparation du complexe R-Smad/Smad4 par Ski et SnoN, blocage de la transcription par TGIF ou SnoN

- Impact de la phosphorylation des Smad sur leur localisation subcellulaire

Comme indiqué dans le paragraphe II.3.b, les protéines Smad peuvent être régulées par des phosphorylations dans leur région charnière entraînant des changements dans le panel de gènes régulés par le TGFβ.

La déphosphorylation des protéines Smad et plus particulièrement de leur région -SSXS- joue aussi un rôle crucial dans la régulation de la voie de signalisation du TGFβ. En effet, l'export nucléaire des protéines R-Smad est dépendant de leur état de phosphorylation (fig. 11). C'est seulement en 2006 que la première phosphatase PPM1A pour les protéines R-Smad a été identifiée (Hill, 2006; Lin et al., 2006). PPM1A déphosphoryle les R-Smad dans le noyau, ce qui permettrait leur export nucléaire (Lin et al., 2006). Une autre étude suggère que les protéines R-Smad peuvent aussi être déphosphorylées dans le cytoplasme par MTMR4 (Yu et al., 2010). Cependant une étude récente remet en cause cette découverte. En effet, une interaction avec les protéines R-Smad et un impact sur la voie de signalisation du TGFβ ne suffisent pas pour conclure que la protéine MTMR4 est une phosphatase (Bruce and Sapkota, 2012). De plus la même équipe a démontré que PPM1A était cytoplasmique et non nucléaire dans une dizaine de lignées cellulaires, ce qui remet en cause sa capacité à déphosphoryler les R-Smad dans le noyau (Bruce et al., 2012). Dans cet article, la protéine PP5 est identifiée comme une possible phosphatase de Smad3 (Bruce et al., 2012).

Les protéines phosphatases sont d'une extrême importance dans la régulation de la réponse des cellules au TGFβ, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour identifier clairement les phosphatases intervenant dans la déphosphorylation de la région -SSXS- des protéines R-Smad.

b. Régulation par la protéine Smad7

La protéine Smad7 est une protéine I-Smad. Contrairement aux protéines Smad, le domaine N-terminal de Smad7 n'est pas un domaine MH1 (fig. 9). Smad7 comprend par contre un domaine MH2 commun à toutes les protéines Smad. L'expression de Smad7 est induite par l'activation de la voie de signalisation du TGFβ, agissant donc dans une boucle de rétro-contrôle négatif de la voie (fig. 8). L'expression de Smad7 est aussi régulée par d'autres

cytokines telles que l'IFNγ ou le TNFα qui peuvent induire l'expression de Smad7, régulant ainsi la voie de signalisation du TGFβ par un signal antagoniste (Shi and Massagué, 2003). La protéine Smad7 inhibe la voie de signalisation du TGFβ à plusieurs niveaux.

- Inhibition de l'activation des protéines R-Smad

Grâce à son domaine MH2 commun avec les autres protéines Smad, Smad7 se lie au TβRI. Une des conséquences de cette liaison est l'inhibition de la phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 en empêchant leur liaison au récepteur et leur activation (Hayashi et al., 1997). La liaison de Smad7 au TβRI permet aussi le recrutement de GADD34, une phosphatase qui inactive le TβRI et la voie de signalisation du TGFβ en déphosphorylant TβRI (Shi et al., 2004).

- Inhibition de la transcription induite par le TGFβ

La protéine Smad7 inhibe aussi la voie de signalisation du TGFβ en prévenant la formation des complexes de protéines Smad, régulant ainsi l'expression génique en réponse au TGFβ dans le noyau (Zhang et al., 2007). Smad7 peut interagir avec l'ADN grâce à son domaine MH2. Une fois liée à l'ADN la protéine Smad7 interagit avec des histones déacetylases qui induisent des changement de conformation de la chromatine et donc affectent la transcription des gènes cibles de la réponse au TGFβ (Yan and Chen, 2011).

- Recrutement de protéines ubiquitine-ligases

Enfin la protéine Smad7 inhibe la signalisation du TGFβ en recrutant des protéines ubiquitine-ligases telles que Smurf2 et Smurf1 (Kavsak et al., 2000). A l'état basal, Smad7 est localisée dans le noyau des cellules. La liaison aux protéines Smurf entraîne sa sortie du noyau. La liaison au TβRI, permet le rapprochement des protéines Smurf du TβRI et favorise

l'ubiquitination de ce dernier. L'interaction de Smad7 avec les protéines Smurf a lieu au niveau du domaine PY de Smad7 (fig. 9).

c. Régulation au niveau du complexe R-Smad/Smad4

La protéine Smad7 n'est pas la seule protéine à intervenir dans le maintien du complexe R-Smad/Smad4.

- TGIF

La protéine TGIF (TGFβ interacting factor) est un répresseur transcriptionnel de la voie de signalisation du TGFβ. En interagissant avec les R-Smad, TGIF recrute un complexe de corépresseurs et entre en compétition avec les co-activateurs de la voie de signalisation. TGIF peut aussi induire la dégradation de Smad2 en recrutant l'ubiquitine ligase WWP1/Tiul1. TGIF est un facteur important qui régule la durée et l'intensité de la réponse au TGFβ (Itoh and Itoh, 2011).

- Ski et SnoN

Les facteurs Ski et SnoN ont été identifiés comme des régulateurs négatifs particulièrement importants de la voie de signalisation du TGFβ (Luo, 2004). Ski et SnoN interagissent simultanément avec Smad2 et Smad3 par leur région N-terminale, et avec Smad4 par leur domaine SAND-like. Ils bloquent ainsi la capacité des Smad à activer la transcription des gènes cibles du TGFβ (Wu et al., 2002). Ski et SnoN sont également capables d'empêcher l'interaction des R-Smad avec leurs activateurs transcriptionnels (Itoh and Itoh, 2011). Lorsque les cellules sont stimulées par le TGFβ, l'inhibition exercée par SnoN et Ski sur le complexe R-Smad/Smad4 est rapidement levée car la stimulation par le TGFβ des cellules induit la dégradation de SnoN par la protéine ubiqutine-ligase Arkadia.

d. Régulation par ubiquitination et ubiquitination-like

La voie de signalisation du TGFβ est hautement régulée par ubiquitination. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle de protéines cibles par une chaîne de réactions enzymatiques, aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines ubiquitine sur une lysine. Cette modification peut être un signal de dégradation mais aussi de régulation de la signalisation, du trafic ou de la localisation de certaines protéines. Le nombre et l'agencement des ubiquitines déterminent le destin de la protéine cible. Les enzymes clés du processus d'ubiquitination sont les protéines ubiquitine-ligases. Les ubiquitine-ligases intervenant dans la voie de signalisation du TGFβ régulent la localisation, l'activité et la stabilité des acteurs de la voie (Dupont et al., 2012).

Parmi, les protéines ubiquitine-ligase ciblant la voie de signalisation du TGFβ, la protéine Itch peut poly-ubiquitiner Smad2, augmentant son affinité pour le TβR et favorisant donc la voie de signalisation (Tang and Zhang, 2011). Le rôle de la protéine ubiquitine-ligase Arkadia est controversé. D'un côté il a été mis en évidence que cette protéine pouvait ubiquitiner et entraîner la dégradation de Smad2 et Smad3 phosphorylées, bloquant ainsi la voie de signalisation du TGFβ (Mavrakis et al., 2007). D'un autre côté la protéine Arkadia a été identifiée pour induire la dégradation de SnoN favorisant donc la voie de signalisation Smad-dépendante (Levy et al., 2007; Nagano et al., 2007).

La phosphorylation de la région charnière des protéines R-Smad est un facteur important pour leur ubiquitination. En effet certaines ubiquitine-ligases, telles que la protéine NEDD4-L (Gao et al., 2009), reconnaissent et ubiquitinent les protéines R-Smad uniquement si elles sont phosphorylées dans un motif précis. Smad4 est constitutivement phosphorylée. Il a été mis en évidence que ces phosphorylations pouvaient contrôler son ubiquitination et sa dégradation dans certains cancers (Wrighton et al., 2009).

La protéine Smad4 est quant à elle ciblée par la protéine ubiquitine-ligase Trim33 (ou TIF1γ). La mono-ubiquitination de Smad4 par Trim33 bloque la capacité de Smad4 à interagir avec les protéines R-Smad et donc inhibe la voie de signalisation du TGFβ (Dupont et al., 2012; Morsut et al., 2010). TIF1γ peut aussi interagir avec Smad2 et induire la transcription d'un certain nombre de gènes en réponse au TGFβ (Andrieux et al., 2012; He et al., 2006). Smad4 peut aussi être sumoylée. La sumoylation est une modification post-traductionnelle dit « ubiquitine-like » Cette modification post-traductionnelle aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. La sumoylation de Smad4 a pour conséquence soit une augmentation, soit une inhibition de la voie de signalisation (Liang et al., 2004; Long et al., 2004). Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par le contexte cellulaire crucial pour la réponse au TGFβ.

L'ubiquitine-ligase Smurf2 a un rôle déterminant dans la régulation de la voie de signalisation, dépassant le cadre de son activité ubiquitine-ligase, c'est pourqoui le détail de ses fonctions est présenté dans le paragraphe suivant.

Il est enfin important de souligner que si l'ubiquitination est un processus capital dans la régulation de la voie de signalisation du TGFβ, c'est un processus réversible. Des protéines dé-ubiquitine ligases interviennent dans le maintien de la réponse des cellules au TGFβ (Dupont et al., 2009; Eichhorn et al., 2012; Zhang et al., 2012a).

e. Les rôles de la protéine Smurf2

http://www.nature.com/onc/journal/v23/n11/fig_tab/1207412f3.html#figure-title

Figure 12 : La protéine Smurf2. Cette protéine est composée d'un domaine C2 en position N-terminale, de 3 domaines WW et d'un domaine HECT en position C-terminale, d'après Izzi et Attisano, 2004.

Les protéines Smurf1 et Smurf2 sont des E3-ubiquitine ligases ayant 80% d'identité de séquences. Elles sont composées d'un domaine C2 en position N-terminale (domaine de liaison lipides/Ca^{2+}), de domaines WW (domaines d'interactions protéines/protéines) et d'un domaine HECT ligase en position C-terminale (domaine à activité ubiquitine ligase) (Izzi and Attisano, 2004) (fig. 12). Smurf1 et Smurf2 diffèrent par le nombre de domaines WW qui est, respectivement, de deux et trois. Seule la protéine Smurf2 est décrite ici, la protéine Smurf1 ciblant plutôt les acteurs de la voie BMP (Smad1 et Smad5). Les domaines WW2 et WW3 de Smurf2 interagissent avec le domaine PY des protéines Smad (Kavsak et al., 2000; Lin et al., 2000).

L'activité enzymatique du domaine HECT de Smurf2 est inhibée à son niveau basal par l'interaction de ce domaine C-terminal avec son domaine N-terminal C2. Cette interaction bloque aussi l'auto-ubiquitination de Smurf2. L'interaction de Smurf2 avec Smad7 induit un changement de conformation de Smurf2 permettant ainsi à l'enzyme d'être active (Wiesner et al., 2007).

La protéine Smurf2 a de nombreuses fonctions (fig. 13). Comme cela a déjà été détaillé dans les paragraphes précédents, Smurf2 joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ. Cette protéine

- influence la localisation nucléaire de Smad7
- dégrade TβRI
- module l'endocytose du complexe de récepteurs.

De plus, la protéine Smurf2 induit aussi la dégradation de Smad2. Smurf2 se lie à Smad2 phosphorylée ce qui entraine sa dégradation (Lin et al., 2000) et contribue au rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ. Il a été montré que l'activation de la voie de signalisation du TGFβ augmentait fortement l'interaction entre ces deux protéines, confirmant

la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négatif dépendant de Smurf2 (Izzi and Attisano, 2004).

La protéine Smurf2 interagit aussi avec la protéine Smad3. Cette interaction est connue depuis plus de dix ans (Lin et al., 2000), cependant, ce n'est que récemment qu'une étude a mis en évidence une mono-ubiquitination de Smad3 par Smurf2 (Tang et al., 2011). Cette mono-ubiquitination n'a lieu que lorsque Smad3 est phosphorylée dans sa région charnière sur la tyrosine 179, après stimulation par le TGFβ. Cette mono-ubiquitination empêche la formation des complexes R-Smad/Smad4, régulant ainsi la voie de signalisation du TGFβ (Tang and Zhang, 2011; Tang et al., 2011).

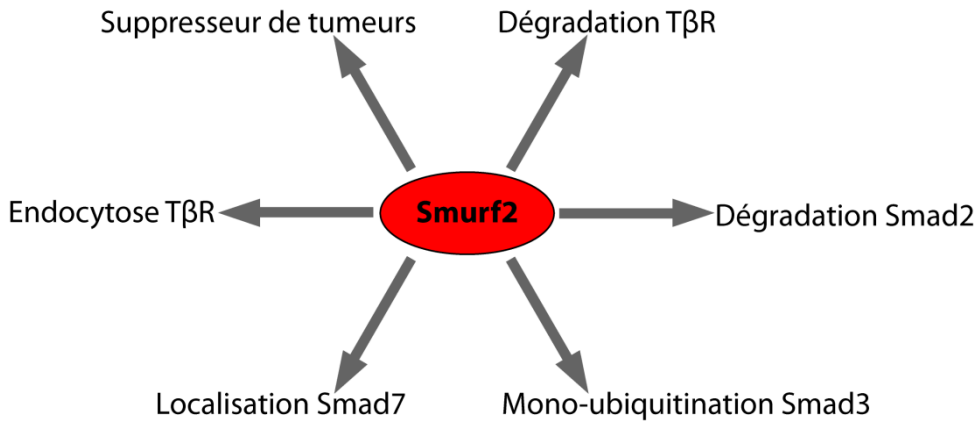


Figure 13 : Les différentes fonctions de la protéine Smurf2.

La protéine Smurf2 a aussi des fonctions indépendantes de la voie de signalisation du TGFβ. Des évidences de plus en plus nombreuses indiquent que cette protéine est impliquée dans la carcinogenèse. La surexpression de Smurf2 est capable d'induire la sénescence des cellules (Zhang and Cohen, 2004). De plus des études réalisées chez des souris Smurf2-/- ont permis de montrer un rôle suppresseur de tumeurs de Smurf2. En effet, ces souris KO développent spontanément des tumeurs comme par exemple le CHC (Blank et al., 2012; Ramkumar et al., 2012). Un des mécanismes proposé pour expliquer ce rôle de Smurf2 dépend de la protéine RNF20. L'absence de Smurf2 chez les souris permet la stabilisation de la protéine RNF20, une protéine E3-ubiquitine ligase connue pour mono-ubiquitiner l'histone

H2B, ce qui a pour conséquence d'altérer la structure de la chromatine et d'induire ainsi une instabilité génétique favorable au développement de cancers (Blank et al., 2012). Cependant le rôle de Smurf2 est surement plus complexe, en effet dans le cancer du sein, la surexpression de la protéine Smurf2 a été associée à une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire (Jin et al., 2009).

Récemment il a été découvert que la protéine Smurf2 peut induire la dégradation d'autres protéines telles que la protéine krüppel 5 like (Du et al., 2011) ou encore la protéine connexine 43 (Fykerud et al., 2012). On peut donc s'attendre à ce que de nombreuses autres fonctions de Smurf2 soient découvertes dans les années à venir.

III. Le TGFβ dans les maladies du foie associées à l'infection par le VHC

De nombreuses évidences cliniques indiquent que le TGFβ est une cytokine cruciale dans le développement des maladies associées à l'infection chronique par le VHC. En effet, le taux de TGFβ circulant est plus important chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Paradis et al., 1996; Ray et al., 2003). De plus, cette augmentation de TGFβ est en corrélation avec le développement de la fibrose et du CHC (Gabriel et al., 2008; Ito et al., 1991). Le TGFβ est une cytokine multifonctionnelle ayant souvent des rôles antagonistes selon le contexte cellulaire. Enfin, comme indiqué dans le chapitre II, de nombreux mécanismes contrôlent la réponse des cellules au TGFβ. Il est donc important de tenir compte de tous ces facteurs lorsque l'on étudie la réponse au TGFβ.

1. La cytokine TGFβ et l'infection par le VHC

Les régulations de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC sont nombreuses. Ces protéines peuvent, en effet, réguler la synthèse et l'activation du TGFβ mais aussi réguler les fonctions de nombreux acteurs de la voie de signalisation. La réciproque est aussi vraie, puisque le TGFβ régule la réplication du VHC.

a. Impact du VHC sur la synthèse et l'activation du TGFβ

La première évidence de l'impact des protéines virales sur la synthèse du TGFβ dans les hépatocytes date de 2004 (Schulze-Krebs et al., 2005). Dans ce travail, il a été montré que dans des cellules exprimant le réplicon subgénomique, les protéines virales non structurales induisent la synthèse et l'activation du TGFβ. L'augmentation de synthèse est liée à la

production de ROS induite par l'infection virale (Lin et al., 2010). Les protéines Core, NS3-4A et NS5A sont plus particulièrement impliquées dans l'induction de ROS, conduisant à l'augmentation de synthèse du TGFβ (Presser et al., 2011). L'infection virale augmente aussi la synthèse de protéases telles que la furine et la thrombospondine-1 qui sont impliquées dans la libération du TGFβ actif (Presser et al., 2011).

b. Impact du TGFβ sur la réplication virale

Un certain nombre d'évidences indique que le TGFβ soutient la réplication du VHC. En effet, l'extinction du TGFβ1 par un si-ARN supprime la réplication du VHC, confirmant le rôle positif du TGFβ dans la réplication du virus (Presser et al., 2011). Il a été mis en évidence que le VIH pouvait augmenter la réplication du VHC par un mécanisme dépendant du TGFβ (Lin et al., 2008). Enfin, dans des conditions d'hypoxie, la synthèse de TGFβ est augmentée ainsi que la réplication virale (Wilson et al., 2012). Cet ensemble de résultats laisse donc penser que le TGFβ augmente la réplication virale. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour identifier les mécanismes impliqués.

2. Le TGFβ et la fibrose du foie

a. Généralités

Depuis de nombreuses années, il est reconnu que le TGFβ est une cytokine cruciale dans la fiborgenèse. En effet, il a été démontré chez des souris transgéniques que la seule expression du TGFβ était suffisante pour induire la fibrose du foie (Kanzler et al., 1999; Ueberham et al., 2003). De plus, le blocage de la voie de signalisation du TGFβ permet d'inhiber la progression de la fibrose et même d'inverser le processus (Meindl-Beinker and Dooley, 2008). La figure 14 récapitule les actions du TGFβ sur le foie conduisant au développement de la fibrose.

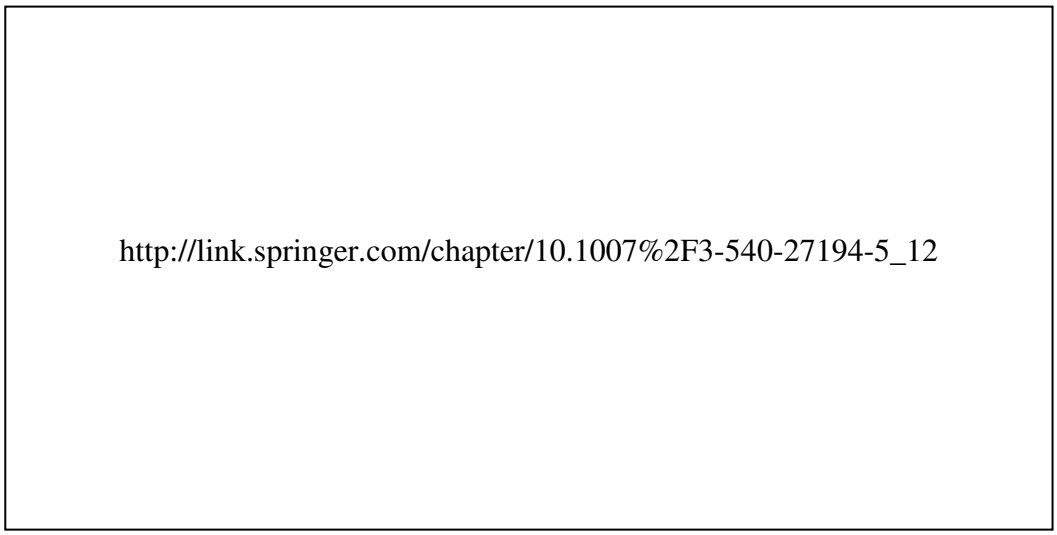


Figure 14 : Impact du TGFβ sur la fibrogenèse du foie. Le TGFβ est une cytokine cruciale de la fibrogenèse, elle agit sur les différents types cellulaires présents dans le foie, conduisant à des changements quantitatifs et qualitatifs de la MEC caractéristiques de la fibrose. D'après Gressner et al, 2005.

Dans le foie, la fibrogenèse est principalement liée à l'activation des cellules étoilées hépatiques (ou Hepatic Stellate Cell, HSC). Une fois activées, ces cellules se transforment en myofibroblastes, principaux responsables de la sécrétion accrue des protéines de la MEC. Le TGFβ joue un rôle déterminant dans l'activation paracrine et autocrine des HSC. La transformation des HSC en myofibroblastes a plusieurs conséquences : (1) augmentation de l'expression des gènes de la MEC, (2) diminution de l'expression des métallo-protéases de la matrice (MMP) et augmentation de l'expression des inhibiteurs de ces métallo-protéases (TIMP) bloquant ainsi la dégradation de la MEC, (3) augmentation de l'expression de collagènes, de protéoglycanes et de glycoprotéines (Gressner et al., 2005). Les myofibroblastes ont donc un rôle important dans la transformation de la MEC durant la fibrogenèse. L'activation des HSC conduit aussi à l'augmentation de la synthèse du TGFβ induisant ainsi une boucle d'activation capitale dans le développement de la fibrose. La voie de signalisation du TGFβ qui dépend des protéines Smad joue un rôle crucial dans l'activation des HSC et plus particulièrement la protéine Smad3 (Flanders, 2004; Liu et al., 2003; Uemura

et al., 2005). Le TGFβ coopère aussi avec d'autres cytokines lors de l'activation des HSC, tel que PDGF (platelet-derived growth factor). Ces coopérations induisent des phosphorylations des protéines R-Smad dans leur région charnière ce qui influence la réponse des HSC au TGFβ et favorise le développement de la fibrose du foie (Yoshida and Matsuzaki, 2012).

La progression de la fibrose du foie est aussi favorisée par le rôle immunosuppresseur du TGFβ. En effet le TGFβ inhibe la réponse immune en stimulant les lymphocytes T régulateurs, en bloquant la prolifération des lymphocytes B et T, en inhibant la production de cytokines effectrices telles que l'IL2 et l'IL4, en bloquant la fonction des cellules dendritiques, et en régulant les fonctions des macrophages (Yang et al., 2010; Yoshimura et al., 2010).

L'importance de la signalisation du TGFβ dans les hépatocytes pour la fibrogenèse fait débat. Le TGFβ est capable d'induire l'apoptose et l'arrêt de croissance des hépatocytes. Il participe ainsi au développement de la fibrose en jouant sur l'homéostasie de la masse du foie au cours des processus de régénération (Gressner et al., 2005). Il semblerait cependant que l'apoptose des hépatocytes induite par le TGFβ soit un phénomène mineur et que la signalisation du TGFβ ait un rôle plus « actif » dans la fibrose. En effet, le TGFβ est capable d'induire la synthèse de CTGF (connective tissue growth factor) dans les hépatocytes favorisant ainsi la progression de la fibrose (Meindl-Beinker and Dooley, 2008). De plus, une étude a montré que l'induction de la fibrose par CCl4 était moins importante chez les souris transgéniques surexprimant la protéine Smad7 dans les hépatocytes que chez les souris contrôles (Dooley et al., 2008). Une autre étude réalisée chez la souris a mis en évidence que durant le remodelage tissulaire l'augmentation de TGFβ était associée à la synthèse du facteur de transcription Snail1 par les hépatocytes, déclenchant ainsi toute une série de processus aboutissant à la fibrose : expression de facteurs de croissance, synthèse de MEC et réponse

inflammatoire chronique (Rowe et al., 2011), ce qui confirme l'importance de la voie de signalisation du TGFβ dans les hépatocytes durant la fibrogenèse. La protéine Snail1 est un facteur de transcription important dans l'EMT. L'induction d'EMT dans les hépatocytes a été mise en évidence *in vivo* chez la souris lors de la fibrose induite par CCl4 (Zeisberg et al., 2007) cependant l'importance de ce processus la fibrogenèse toujours remise en cause (Taura et al., 2010). Dans le paragraphe II.3 je reviendrai sur les mécanismes et les fonctions de l'EMT.

b. Influence du VHC dans l'induction de la fibrose du foie dépendant du TGFβ

L'effet des protéines virales sur l'induction directe de la fibrose a déjà été détaillé dans le paragraphe I.3.b. Ici, nous nous focalisons sur les perturbations du TGFβ et de sa voie de signalisation dans l'induction de la fibrose du foie associée à l'infection par le VHC.

Chez les patients chroniquement infectés par le VHC, le taux de TGFβ circulant est plus élevé et il est corrélé avec le stade de développement de la fibrose (Gabriel et al., 2008; Kamal et al., 2006). Comme cela été indiqué précédemment, l'augmentation du taux de TGFβ est associée à la réplication du virus (Schulze-Krebs et al., 2005) et plus particulièrement aux protéines virales NS3-4A, Core et NS5A (Presser et al., 2011). Des co-cultures d'hépatocytes infectés et de HSC ont permis de mettre en évidence que l'augmentation d'expression de TGFβ dans les hépatocytes répliquant le virus conduit à l'activation des HSC et à la fibrogenèse (Schulze-Krebs et al., 2005). De plus, il a été démontrée que la protéine Core augmente la synthèse de TGFβ1 mais aussi la synthèse de CTGF, deux cytokines cruciales dans la progression de la fibrose (Shin et al., 2005).

En plus de l'augmentation de la synthèse de TGFβ, il a été démontré que chez les patients chroniquement infectés, le TGFβ active non seulement le TβR mais aussi JNK, ce qui conduit à la phosphorylation des protéines R-Smad dans leur région charnière. Ce changement de

phosphorylation est associé au développement de la fibrose (Matsuzaki et al., 2007). En outre, il a récemment été démontré que l'infection par le VHC était associée à une augmentation de miR-21 et que l'expression de ce micro ARN est en corrélation avec la progression de la fibrose (Marquez et al., 2010). Les micro-RNA sont de petits ARN jouant un rôle important dans l'expression génique. L'augmentation de miR-21 est associée à une augmentation de la signalisation du TGFβ grâce au ciblage de Smad7 par ce miR et pourrait donc jouer un rôle crucial dans la fibrogenèse (Marquez et al., 2010).

3. Le TGFβ et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

a. Généralités

L'EMT est un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses (fig. 15). Ce processus requiert des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. Les cellules épithéliales sont des cellules polarisées, adhérant à la MEC et formant des couches de cellules cohésives grâce aux complexes de protéines intercellulaires (fig. 15). Les cellules épithéliales forment ainsi des barrières caractérisées par la capacité des cellules à communiquer entre elles, notamment grâce aux jonctions serrées (Firrincieli et al., 2010). L'EMT est un processus au cours duquel les cellules épithéliales vont se différencier en cellules mésenchymateuses acquérant ainsi de la mobilité. Les cellules mésenchymateuses, sont des cellules non polarisées, sans interactions intercellulaires, capables de se déplacer individuellement dans la MEC, participant à sa formation (fig. 15) (Firrincieli et al., 2010; Xu et al., 2009). L'EMT a lieu en trois étapes : (a) la perte des molécules d'adhésions des cellules épithéliales telles que E-cadhérine ou ZO1, (b) l'acquisition de marqueurs mésenchymaux comme l'α-smooth muscle actin (αSMA) ou la vimentine, (c) le remodelage du cytosquelette et des changements morphologiques (Bi et al., 2012). Les changements phénotypiques

associés à l'EMT sont la perte de polarité apico-basale, la perturbation des jonctions serrées, des modifications d'expression des protéines du cytosquelette et l'acquisition de propriétés invasives et de migration (Firrincieli et al., 2010).

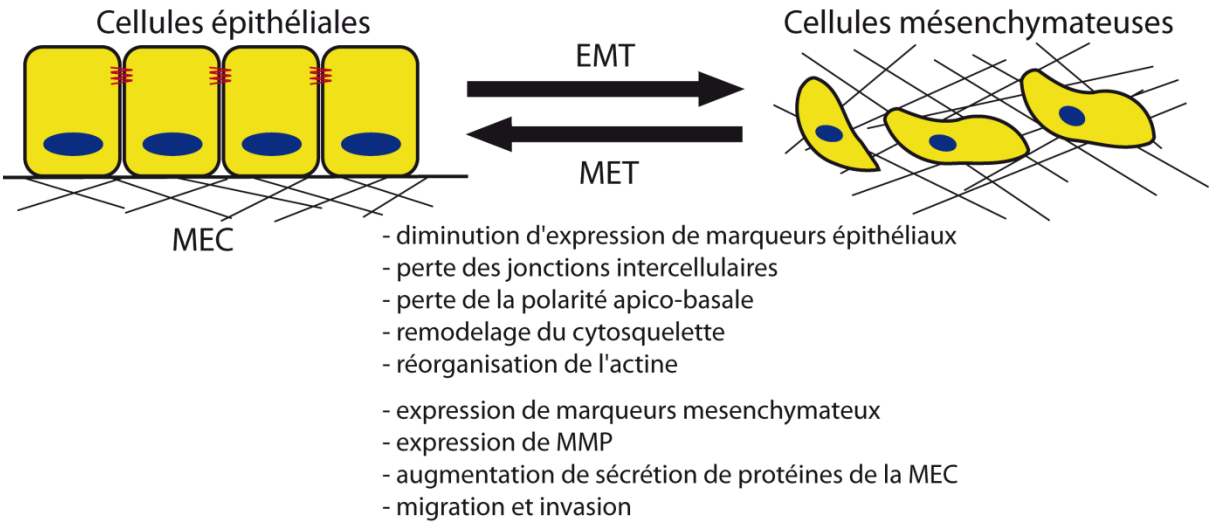


Figure 15 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse. L'EMT se caractérise par une perte des marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux, ainsi que des changements phénotypiques. Ce processus est un processus réversible, le processus inverse étant appelé la transition mésenchymo-épithéliale (MET)

On distingue trois types d'EMT. L'EMT de type I intervient pendant l'embryogenèse et la formation des tissus. L'EMT de type II se réfère à une trans-différenciation des cellules lors de phénomènes physiologiques comme la cicatrisation ou la régénération des tissus, mais aussi lors de la fibrose. Enfin, l'EMT de type III est caractéristique d'un développement pathologique avancé, la néoplasie et la formation de métastases. L'EMT de type III est considérée comme une EMT dite oncogénique (Thiery et al., 2009; Wendt et al., 2012). L'EMT est une des premières étapes dans le processus de formation de métastases et d'invasion lors de la carcinogenèse (Firrincieli et al., 2010). Dans ce travail, nous nous intéressons à l'EMT de type III.

b. Mécanismes d'induction de l'EMT par le TGFβ

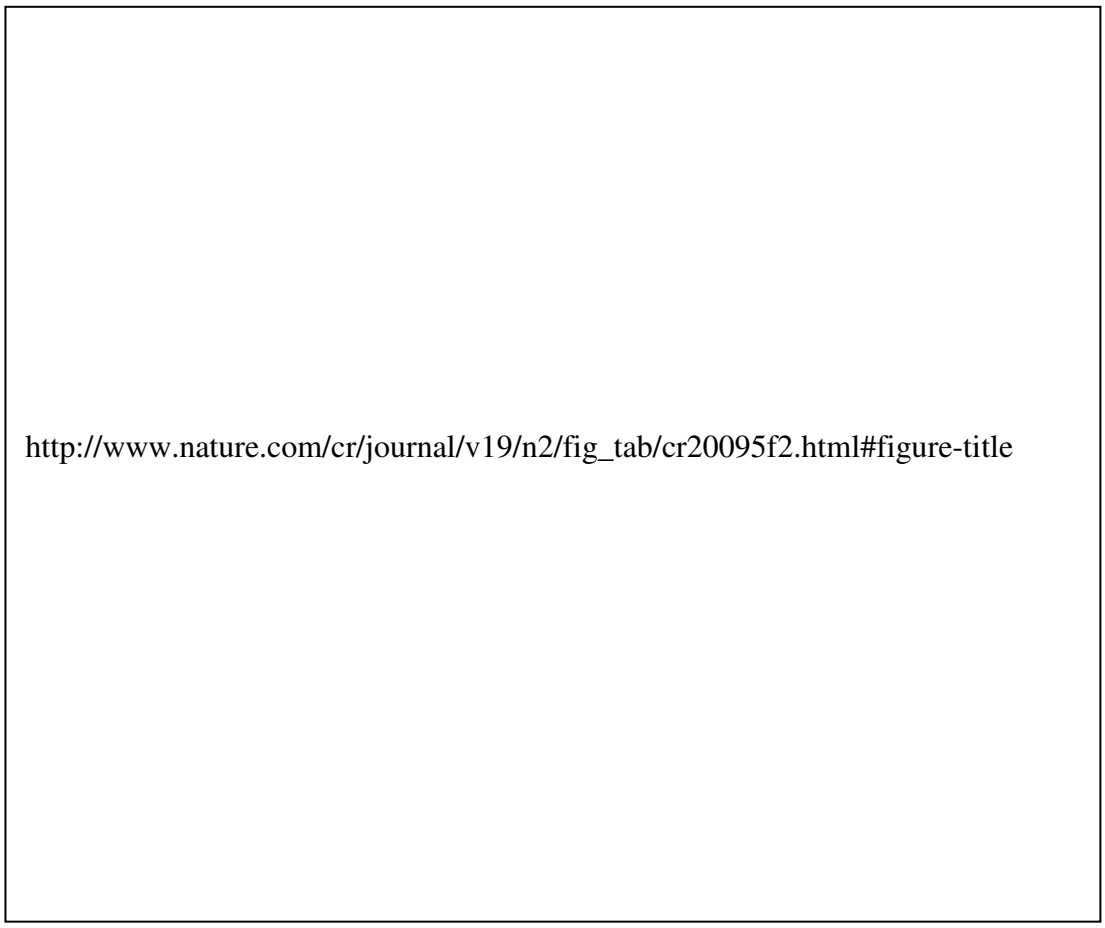


Figure 16 : Régulation transcriptionnelle de l'EMT induit par le TGFβ. En réponse au TGFβ, Smad2 et Smad3 sont activés et s'associent avec Smad4 pour former un facteur de transcription. Dans l'induction de l'EMT, le complexe R-Smad/Smad4 régule la transcription grâce à 3 familles de facteurs de transcription, résultant en la régulation à la baisse des marqueurs épithéliaux et en la régulation à la hausse des marqueurs mésenchymateux. D'après Xu et al, 2009.

Le TGFβ est une cytokine cruciale dans l'induction de l'EMT. Des études réalisées chez des souris transgéniques ont permis de mettre en évidence que Smad3 et Smad4 étaient indispensables à l'induction de l'EMT par le TGFβ (Heldin et al., 2012; Xu et al., 2009). Le TGFβ et les protéines Smad régulent l'induction de l'EMT grâce à la modulation de trois familles de facteurs de transcription : la famille Snail, la famille ZEB et la famille bHLH, conduisant ainsi à la régulation à la baisse des marqueurs épithéliaux et à la régulation à la hausse des marqueurs mésenchymateux (fig. 16) (Heldin et al., 2012; Xu et al., 2009). Le rôle commun de Snail, Twist et ZEB est la répression négative de l'expression de l'E-cadhérine.

L'E-cadhérine est une protéine essentielle dans le maintien de l'intégrité d'un épithélium. L'inhibition de sa synthèse est une étape cruciale de l'EMT. Parmi les marqueurs mésenchymateux régulés par ces facteurs de transcription, la vimentine est un marqueur clé. Cette protéine est un membre de la famille des filaments intermédiaires, importants pour la structure du cytosquelette. La vimentine est une protéine dynamique qui apporte une certaine plasticité à la cellule. Ces facteurs de transcription augmentent aussi l'expression de protéines pro-invasives telles que certaines MMP qui favorisent la dégradation de la MEC ou de la fibronectine. Il est important de souligner que l'induction des facteurs de transcription de la famille Snail régule aussi les autres facteurs de transcription ZEB1/2, Twist et Ids conduisant ainsi au maintien du processus d'EMT (fig. 16).

Le TGFβ induit également l'activation d'autres voies de signalisation indépendantes des protéines Smad telles que la voie Ras/Erk ou bien la voie PI3K/mTor qui jouent aussi un rôle important dans l'induction de l'EMT (Heldin et al., 2012; Xu et al., 2009). De plus, d'autres voies de signalisation peuvent être activées et coopérer avec la voie de signalisation du TGFβ dans l'induction de l'EMT. C'est notamment le cas des signalisations activées par les protéines Notch et Wnt (Guo and Wang, 2009). L'activation de la voie de signalisation des protéines Wnt induit notamment la séquestration de GSK-3β, inhibant ainsi la phosphorylation et la dégradation de Snail. La stabilisation de Snail participe activement au processus d'EMT (Yook et al., 2006). La protéine Notch induit aussi l'expression des facteurs de transcription de la famille Snail : l'expression seule de Notch induit l'expression de Snail2 (Slug) et en coopération avec le TGFβ l'expression de Snail (Niessen et al., 2008; Wang et al., 2012). Enfin d'autres facteurs de croissance peuvent coopérer avec le TGFβ : le facteur de croissance épithélial (EGF), le PDGF, le facteur de croissances des hépatocytes (HGF). Les différentes coopérations mises en place sont décrites dans la revue de Said & Williams (Said and Williams, 2011).

c. L'EMT dans le foie

L'EMT, dans le foie, joue un rôle crucial, notamment dans le développement de la fibrose et du CHC (Firrincieli et al., 2010). Comme indiqué dans le paragraphe III.1.a, le rôle de l'EMT dans les HSC est un processus important dans le développement de la fibrose du foie. Cependant dans les autres cellules hépatiques, c'est un sujet controversé. Ainsi, malgré de nombreuses évidences indiquant que les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires peuvent participer au développement de la fibrose en subissant une EMT (Díaz et al., 2008; Dooley et al., 2008; Meindl-Beinker and Dooley, 2008; Rowe et al., 2011; Rygiel et al., 2008; Zeisberg et al., 2007) , des analyses de suivi de cellules par triple marquage réalisées chez la souris remettent en cause ces résultats (Chu et al., 2011; Scholten et al., 2010; Taura et al., 2010).

Dans le cancer, l'EMT est une étape cruciale dans la promotion de la migration cellulaire, l'invasion tumorale et la formation de métastases. Dans le CHC, le processus d'EMT a été lié à la capacité des cellules tumorales hépatiques à envahir la capsule ou la veine porte (Firrincieli et al., 2010). Dans les hépatocytes néoplasiques, l'EMT est une étape cruciale du développement du CHC associé à un mauvais pronostic (Zhai et al., 2008). De plus, des études réalisées chez des patients atteints de CHC, ont mis en évidence que la surexpression conjointe de Snail et de Twist était en corrélation avec une plus faible espérance de survie (Yang et al., 2009). La surexpression de Snail et de Twist est aussi associée à l'invasion tumorale et au développement de métastases dans le CHC (Lee et al., 2006; Miyoshi et al., 2005). De plus, le TGFβ peut coopérer avec d'autres protéines pour induire l'EMT dans les hépatocytes. C'est notamment le cas de la protéine laminine-5 qui coopére avec le TGFβ pour induire une EMT complète dans les hépatocytes et permettre la transformation de cellules de CHC non invasives en cellules invasives (Giannelli et al., 2005). C'est aussi le cas du facteur PDGF qui induit, en coopération avec le TGFβ, l'EMT dans les hépatocytes jouant un rôle

crucial dans le développement du CHC (Fischer et al., 2007; Gotzmann et al., 2006). En conclusion, l'EMT est un événement prédominant dans la progression tumorale du CHC associée à (a) l'invasion locale d'hépatocytes malins, (b) l'intravasation dans le système vasculaire et (c) l'extravasation et la colonisation métastasique (Van Zijl et al., 2009).

d. L'EMT chez les patients infectés par le VHC

Les mécanismes associant l'infection par le VHC et l'induction d'EMT dans le CHC sont pour l'instant mal connus. Quatre protéines virales pourraient jouer un rôle dans l'induction de l'EMT : Core, E1/E2 et NS5A (Akkari et al., 2012; Battaglia et al., 2009; Wilson et al., 2012).

- La protéine Core

La protéine Core peut participer au processus d'EMT dans le cadre du CHC (Battaglia et al., 2009) mais aussi du cholangiocarcinome (Li et al., 2010b) liés à l'infection chronique par le VHC. Dans le cadre du CHC, il a été montré que la protéine Core, isolée à partir de tumeurs de patients, pouvait interagir avec la protéine Smad3 (Pavio et al., 2005). L'expression de Core dans des hépatocytes a pour conséquence de diminuer la réponse des cellules aux effets pro-apoptotiques du TGFβ et de favoriser l'induction d'EMT par le TGFβ (Battaglia et al., 2009). Dans le cholangiocarcinome, Li *et al* ont montré que dans des biopsies de foie, l'expression de la protéine Core était associée à une diminution d'expression des marqueurs épithéliaux et à une augmentation d'expression des marqueurs mésenchymaux, indiquant la mise en place d'un processus d'EMT (Li et al., 2010b). Le mécanisme proposé est dépendant de la protéine lysil-oxydase-like 2, une protéine essentielle de la MEC coopérant avec le facteur de transcription Snail dans la dérégulation d'expression d'E-cadhérine et dans la progression tumorale (Peinado et al., 2005).

- Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

L'équipe de McKeating a récemment mis en évidence que les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 favorisaient le processus d'EMT en augmentant l'expression de Snail et de Twist dans les hépatocytes (Wilson et al., 2012) par un mécanisme dépendant du facteur de transcription HIF1α. L'expression des protéines E1 et E2 stabilise la protéine HIF1α qui régule l'expression de nombreux gènes intervenant dans la croissance tumorale et les métastases, y compris le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et le TGFβ (Wilson et al., 2012).

- La protéine NS5A

La protéine NS5A a récemment été identifiée comme un régulateur de l'EMT en augmentant l'expression de Twist2 (Akkari et al., 2012). Dans ce modèle l'induction d'EMT est indépendante du TGFβ. Cependant le TGFβ amplifie l'effet de NS5A, montrant ainsi une coopération entre les deux mécanismes d'induction d'EMT. (Akkari et al., 2012).

4. Le TGFβ et la cancérisation : Dr Jekyll et Mr Hyde

Le rôle contradictoire du TGFβ dans le cancer a depuis longtemps été identifié mais les bases mécanistiques et la logistique opérationnelle restent élusives. Dans l'environnement tumoral, la quantité de TGFβ augmente en début de cancérisation afin d'empêcher le développement malin, puis les cellules tumorales détournent la signalisation du TGFβ à leur propre avantage (fig. 17). Les causes de l'altération de la signalisation du TGFβ sont multiples et deux questions clés se sont posées : quelles sont les étapes de la progression tumorale qui bénéficient d'un défaut de la voie de signalisation du TGFβ ? À quel moment le TGFβ agit-il comme un signal pro-tumoral ? Il est important de comprendre comment et

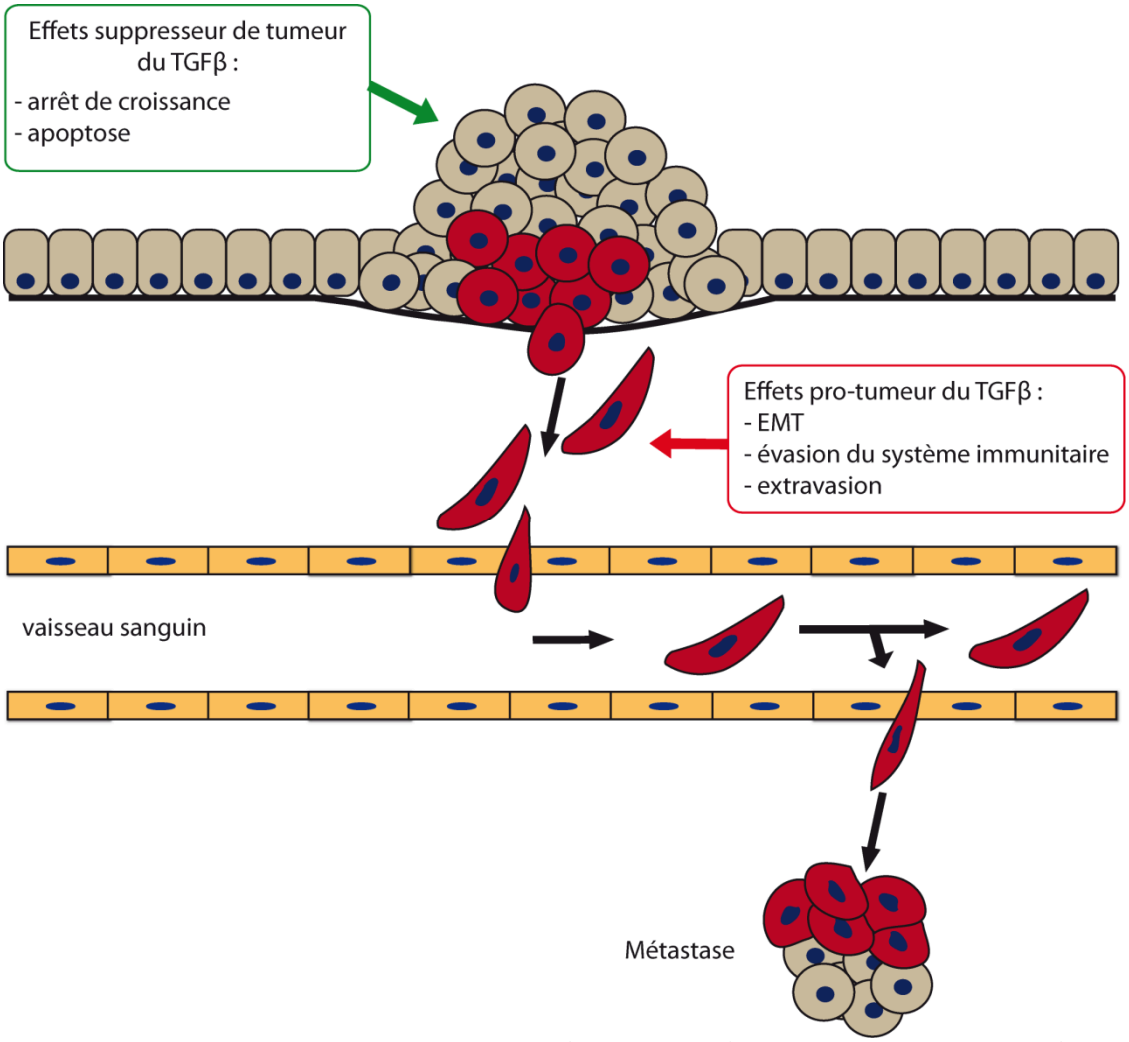


Figure 17 : Impact du TGFβ dans le processus de cancérisation. D'après Heldin et al, 2009. Dans les étapes précoces de cancérisation, le TGFβ a un rôle inhibiteur de tumeur en bloquant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose. Les cellules tumorales détournent ensuite la voie de signalisation à leur avantage et le TGFβ induit l'EMT, l'extravasion et favoriser le développement métastasique.

quand se fait le basculement de la réponse au TGFβ afin de pouvoir développer des traitements adaptés, ciblant la voie de signalisation du TGFβ (Drabsch and Ten Dijke, 2012).

a. Les effets anti-tumoraux du TGFβ

Le TGFβ exerce son action anti-tumorale sur les cellules saines et sur les cellules pré-malignes. Dans les cellules saines le TGFβ inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose, inhibant ainsi le processus de cancérisation (Heldin et al., 2009). Il induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pouvant aller jusqu'à l'induction d'une mort cellulaire programmée. Plusieurs mécanismes ont été identifiés : l'inhibition des CDK (cyclin

dependant kinase) grâce à l'activation de p21 et p15, l'inhibition d'expression de myc et la déphosphorylation de la protéine Rb (Liu and Matsuura, 2005). Les mécanismes mis en place diffèrent selon le type cellulaire étudié.

Le TGFβ inhibe également le développement tumoral en induisant l'apoptose. Là aussi les mécanismes impliqués divergent selon le type cellulaire étudié. Le TGFβ régule l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques et pro-apoptotiques (Drabsch and Ten Dijke, 2012). Dans les hépatocytes, le TGFβ induit notamment l'expression de MKP2, qui augmente les effets pro-apoptotiques de la protéine Bim (Ramesh et al., 2008).

Au fur et à mesure du développement tumoral des changements génétiques et épigénétiques ont lieu dans la cellule et conduisent au basculement de la réponse au TGFβ, de l'inhibition de prolifération à l'induction de croissance et d'invasion.

b. Les effets pro-tumoraux du TGFβ

Le basculement de la réponse au TGFβ entre anti-tumorale et pro-tumorale peut être associé à deux mécanismes soit l'inactivation de la voie de signalisation par des mutations inactivatrices des effecteurs majeurs de la voie de signalisation principalement TβRI, TβRII et Smad4 soit l'inhibition sélective des réponses anti-tumorales des cellules au TGFβ (Padua et al., 2008). L'un des éléments cruciaux de cette réponse est l'induction d'EMT qui a été détaillée dans le paragraphe III.2. Cette induction entraine la migration et l'invasion cellulaires conduisant au développement de métastases (Heldin et al., 2012).De plus, le TGFβ exerce aussi son action pro-tumorale par d'autres mécanismes. Tout d'abord, le TGFβ induit l'expression d'ANGPTL4 (angiopoétine like 4). Cette protéine est capable de dégrader la barrière endothéliale et joue donc un rôle important dans la migration des cellules (Padua et al., 2008). Ensuite, en supprimant la surveillance immune de l'environnement tumoral, le

TGFβ favorise le développement tumoral. Plusieurs mécanismes contribuent à cette immunosuppression comme par exemple la suppression des lymphocytes cytotoxiques et des cellules NK (natural killer) (Yang, 2010). Pour finir, le TGFβ stimule l'angiogenèse par son action sur le réseau des cytokines angiogéniques (CTGF, VEGF). La régulation des MMP et des TIMP par le TGFβ augmente les propriétés migratoires et invasives des cellules endothéliales nécessaires à l'angiogenèse (Padua and Massagué, 2009).

c. Le TGFβ et le CHC

- Généralités

L'importance du TGFβ dans le CHC est connue depuis une vingtaine d'années. En 1991, Ito *et al* mettaient en évidence l'augmentation de l'ARN messager du TGFβ chez les patients développant un CHC (Ito et al., 1991). Quelques années plus tard, la même équipe montrait que l'augmentation de TGFβ dans le plasma des patients développant un CHC (Shirai et al., 1994) et la corrélation positive entre cette augmentation et la vascularisation tumorale (Ito et al., 1995). Depuis de très nombreux articles ont mis en évidence l'association entre l'augmentation de TGFβ et le développement de CHC. Durant le développement du CHC, les cellules du foie vont devenir résistantes aux effets cytotoxiques du TGFβ tout en restant sensibles aux effets promoteurs de tumeur du TGFβ (Giannelli et al., 2011) (fig. 17).

Un des principaux effets tumorogéniques du TGFβ est l'induction de l'EMT, détaillée dans le paragraphe III.2.c, qui joue un rôle crucial dans le CHC (Lee et al., 2006; Reichl et al., 2012; van Zijl et al., 2009; Wang et al., 2012; Yang et al., 2009). En plus de l'induction d'EMT, le TGFβ contribue à l'angiogenèse nécessaire à la cancérisation (Balzarini et al., 2012). Le TGFβ favorise aussi le développement du CHC en stimulant la sécrétion de cytokines telle que CTGF. Ces sécrétions favorisent la croissance tumorale, l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaires (Chu et al., 2008; Mazzocca et al., 2010).

Au vu de la complexité des mécanismes impliqués dans le développement du CHC, deux études de biologie systémique ont été menées. Elles ont permis d'identifier les groupes de gènes impliqués dans le développement du CHC et de confirmer l'importance de la voie de signalisation du TGFβ (Coulouarn et al., 2008; Hoshida et al., 2009). Coulouarn *et al* ont réalisé une étude d'expression génique comprenant des informations de 213 patients développant un CHC, de 7 métastases du foie et de 19 lignées cellulaires dérivant de CHC. A l'aide d'hépatocytes murins ils ont analysé l'expression temporelle des gènes en réponse au TGFβ, et ont identifié deux sous-groupes de gènes impliqués dans le développement du CHC : un groupe de gènes impliqués dans la réponse rapide au TGFβ (signature TGFβ rapide) et un groupe de gènes impliqués dans la réponse tardive au TGFβ (signature TGFβ tardive). Ils ont ensuite démontré que les patients ayant une signature TGFβ tardive avaient une survie moyenne plus faible que les patients ayant une signature TGFβ rapide. De plus les tumeurs exprimant les gènes associés à la signature TGFβ tardive présentent un phénotype invasif. Enfin la signature TGFβ tardive permet de prédire le développement de métastases dans le foie et ce modèle est valable pour d'autres cancers que le CHC (Coulouarn et al., 2008).

Hoshida *et al* ont quant à eux intégré les données d'expression génique de neuf études différentes réalisées à différents stades de CHC et dans différentes zones géographiques. Ils proposent un modèle de trois profils génétiques du CHC associés à différentes évolutions de la maladie. Dans ce modèle les gènes de la réponse au TGFβ sont associés à de mauvaises chances de survie (Hoshida et al., 2009).

Comme indiqué ci-dessus il est important de comprendre les mécanismes associés au basculement de la réponse au TGFβ afin de pouvoir développer des traitements adaptés. Il semblerait que la voie de signalisation du TGFβ reste active dans le cadre du CHC, puisque des mutations inactivatrices dans les gènes de Smad2 et de Smad4 ont été mises en évidence dans moins de 10% des cas (Yakicier et al., 1999). L'inactivation de la signalisation du TGFβ

est donc une piste thérapeutique intéressante. Un essai clinique est actuellement en phase 2 pour étudier les bénéfices d'un traitement avec la molécule LY2157299, un inhibiteur de TβRI qui bloque la phosphorylation des protéines Smad (Bueno et al., 2008), dans lequel le temps médian de progression des patients développant un CHC sera étudié (essai clinique NCT01246986) (Bueno et al., 2008).

- Chez les patients infectés par le VHC

Tous les mécanismes décrits précédemment d'implication du VHC et du TGFβ dans l'induction de la fibrose du foie et de l'EMT jouent un rôle important dans le développement du CHC chez les patients infectés par le VHC.

De plus, chez les patients chroniquement infectés par le VHC et développant un CHC, il a été mis en évidence un taux de TGFβ circulant plus important (Divella et al., 2012) et une quantité de Smad4 plus importante (Yao et al., 2012), suggérant une plus forte signalisation TGFβ. En outre, la phosphorylation de la région charnière des protéines Smad induite par l'activation de JNK par le TGFβ est un marqueur de l'induction de fibrose et de CHC chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Matsuzaki et al., 2007).

Plusieurs protéines virales inhibent l'induction d'apoptose par le TGFβ favorisant ainsi le développement du CHC : la protéine Core, la protéine NS3 et la protéine NS5A (Cheng et al., 2004; Choi and Hwang, 2006; Pavio et al., 2005). Plusieurs mécanismes ont été identifiés. Pour les protéines Core et NS3 le mécanisme proposé dépend de l'interaction de ces protéines avec la protéine cellulaire Smad3 (Cheng et al., 2004; Pavio et al., 2005). L'interaction entre Smad3 et la protéine Core joue aussi un rôle dans l'augmentation d'EMT induite par le TGFβ dans les hépatocytes exprimant la protéine Core (Battaglia et al., 2009). Pour la protéine NS5A le mécanisme d'inhibition de l'apoptose induite par le TGFβ proposé dépend de l'interaction de NS5A et TβRI (Choi and Hwang, 2006).

TRAVAIL

EXPERIMENTAL

I. Le réplicon subgénomique augmente la réponse des cellules au TGFβ et induit un phénotype d'EMT

1. Impact du réplicon subgénomique du VHC sur la réponse des cellules au TGFβ

a. Objectifs

Afin d'étudier l'impact des protéines virales du VHC sur la réponse des cellules au TGFβ, nous avons travaillé avec la lignée Huh9.13 qui exprime le réplicon subgénomique du virus (Lohmann et al., 1999; Pietschmann et al., 2001). Le réplicon subgénomique est une construction génétique utilisant un brin d'ADN, complémentaire, d'une portion de l'ARN du VHC. Cette portion du génome du virus qui code pour les protéines non structurales (NS3 à NS5B) du VHC est capable de se répliquer dans des cultures cellulaires grâce aux mêmes mécanismes que le virus qui infecte les cellules humaines. Afin d'obtenir une lignée contrôle, ces cellules ont été traitées pendant un mois avec de l'IFN-α2a afin d'éliminer le réplicon (fig. 42). Cette lignée a été appelée Huh9.13-cured.

b. Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié la réponse des cellules au TGFβ par PCR quantitative en temps réel, nous nous sommes focalisés sur deux gènes connus pour être régulés directement par le TGFβ : Smad7 et PAI-1. Comme indiqué dans l'introduction Smad7 est une protéine qui intervient dans la boucle de rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ (Kavsak et al., 2000). La protéine PAI-1 est une serpine dont l'expression est régulée par les protéines Smad. Cette protéine joue un rôle crucial dans la fibrose et la cancérisation induites par le TGFβ (Iwaki et al., 2012). La régulation de ces deux

gènes a été étudiée après 6h de stimulation des cellules avec 2,5 ng/mL de TGFβ pour les deux lignées. Les résultats ont été analysés en regard des cellules non stimulées pour chaque lignée (fold change, FC). De façon attendue le TGFβ régule à la hausse ces deux gènes dans la lignée contrôle Huh9.13-cured. Nous avons mis en évidence que dans les cellules Huh9.13 exprimant le réplicon subgénomique, la stimulation par le TGFβ induisait une plus forte régulation de PAI-1 comparé aux cellules contrôles Huh9.13-cured (fig. 18). L'induction d'expression de Smad7 n'est quant à elle pas différentiellement régulée par l'expression du réplicon subgénomique. Cette différence de régulation entre ces deux gènes cibles du TGFβ suggère que le réplicon subgénomique influence qualitativement la réponse des cellules au TGFβ.

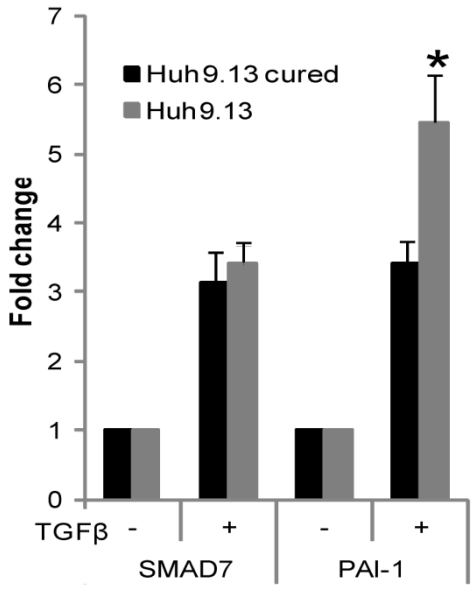


Figure 18 : Le réplicon subgénomique induit une plus forte régulation de PAI-1 par le TGFβ mais n'a pas d'impact sur la régulation de Smad7. Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été stimulées avec 2,5ng/mL de TGFβ ou le véhicule contrôle pendant 6h avant l'extraction d'ARN, la RT-PCR et la PCR quantitative. Les résultats ont été analysés en regard des cellules non stimulées pour chaque lignée (fold change) après normalisation par la GAPDH. * p<0,05 comparé aux cellules contrôle (test de Student).

PAI-1 étant un gène dont l'expression est augmentée dans le processus d'EMT, nous avons décidé d'étudier l'impact du réplicon subgénomique sur ce processus induit par le TGFβ. La régulation de l'expression de 84 gènes liés à l'EMT a été comparée dans les deux lignées cellulaires par PCR-quantitative (PCR array, Qiagen) après 6h de stimulation avec 2,5

ng/mL de TGFβ. L'analyse des résultats, illustrée par le volcano plot (fig. 19A), a permis de mettre en évidence qu'un plus grand nombre de gènes associés à l'EMT est positivement régulé par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, comparé aux cellules contrôles (fig. 19B). La majorité des gènes régulés dans les cellules contrôles l'est aussi dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique (fig. 19B). Parmi les gènes régulés positivement en commun, certains sont plus fortement exprimés dans la lignée exprimant le réplicon subgénomique (fig. 19A et tableau 2). La liste des gènes significativement ($p<0,05$) régulés à la hausse ($FC>2$) ou à la baisse ($FC<-2$) par le TGFβ dans les Huh9.13-cured ou les Huh9.13 est présentée dans le tableau 2.

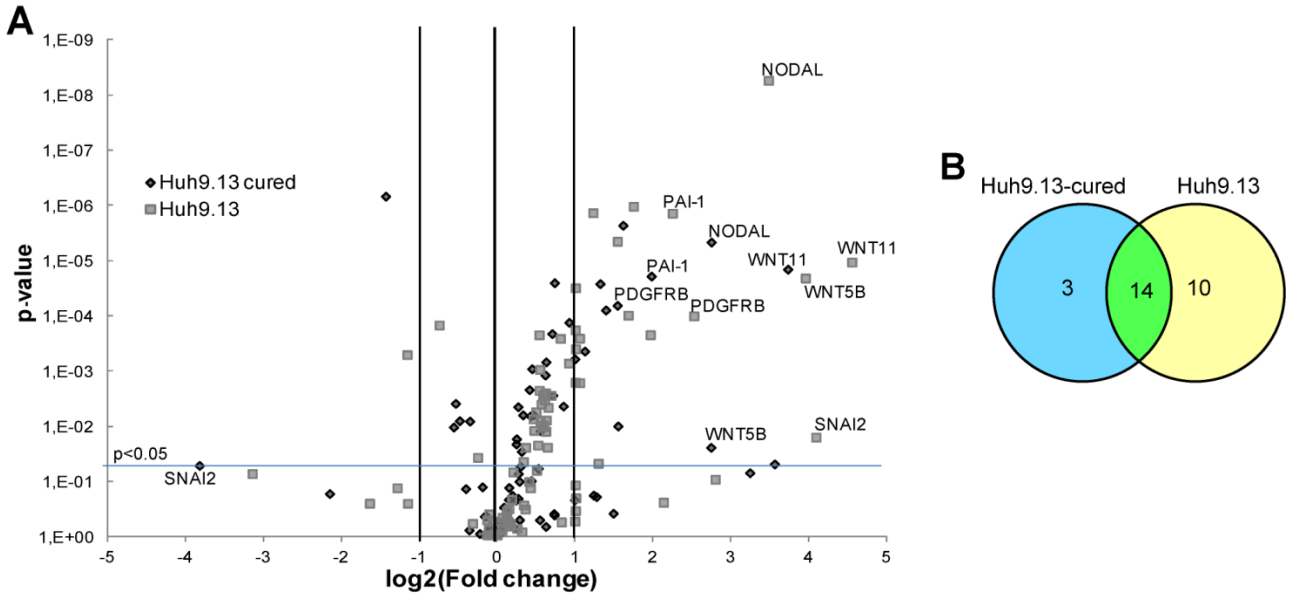


Figure 19 : Régulation de l'expression de gènes de l'EMT par le TGFβ dans les lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured. Les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse et l'extraction des ARN. La quantification de l'expression des gènes a été réalisée par RT-PCR quantitative (PCR array). (A) Après normalisation avec les gènes de ménage (B2M, RPL13A, GAPDH) la modulation de l'expression génique induite par la stimulation TGFβ a été déterminée pour chaque lignée cellulaire en FC. Volcano-plot indiquant les FC induits par le TGFβ et la significativité statistique (p-value) calculée par un test t paramétrique modéré. Les gènes régulés à la hausse (log2(FC)>1) ou à la baisse (log2(FC)<-1) par le TGFβ sont respectivement dans le quadrant supérieur droit et gauche. (B) Diagramme de Venn pour les gènes régulés à la hausse par le TGFβ dans les deux lignées.

Parmi les 84 gènes de la puce, un seul gène est significativement régulé à la baisse par le TGFβ, il s'agit de RGS2. La diminution d'expression de RGS2 est associée à l'EMT (tableau 2) et au développement métastasique (Jiang et al., 2010).

La régulation différentielle de Snai2 (Snail2 ou Slug) est particulièrement intéressante (fig. 19A et tableau 2). En effet, le TGFβ induit fortement l'expression de Snai2 dans la lignée Huh9.13, tandis qu'on observe une forte répression de son expression dans la lignée Huh9.13-cured. Le facteur de transcription Snai2 est impliqué dans l'induction d'EMT et dans la carcinogenèse (Casas et al., 2011).

Tableau 2 : Liste des gènes significativement régulés à la hausse ou à la baisse par le TGFβ dans les deux lignées parmi les 84 gènes présents dans le PCR array EMT (FC indiqué) * p<0.05 (test de Student)

	Huh9.13-cured	Huh9.13	Fonctions associées (Qiagen)
WNT11	13,4*	23,6*	Différenciation & Développement, Morphogenèse, Voie de signalisation WNT
SNAI2	-14,1	17,2*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Différenciation & Développement, Facteur de transcription
WNT5B	6,7*	15,6*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Différenciation & Développement, Voie de signalisation WNT
NODAL	6,8*	11,3*	Différenciation & Développement, Croissance cellulaire & Prolifération, Migration & Motilité
TWIST1	11,9*	7,0	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Différenciation & Développement, Morphogenèse, Facteur de transcription
PDGFRB	2,9*	5,8*	Croissance cellulaire & Prolifération, Migration & Motilité, Voie de signalisation des Récepteurs tyrosine kinase
PAI-1	3,9*	4,8*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, MEC & Adhésion cellulaire
NOTCH1	2,0*	3,9*	Différenciation & Développement, voie de signalisation NOTCH, Facteur de transcription
PLEK2	3,1*	3,4*	Cytosquelette
TGFB1	2,6*	3,2*	Morphogenèse, Croissance cellulaire & Prolifération, Migration & Motilité, MEC & Adhésion cellulaire, Voie de signalisation du TGFβ
IGFBP4	2,9*	2,9*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Croissance cellulaire & Prolifération
ZEB2	2,0	2,5*	Facteur de transcription
CAMK2N1	2,5*	2,4*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT
ITGA5	1,4*	2,1*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, MEC & Adhésion cellulaire, Voie de signalisation des Intégrines
TGFB2	1,6	2,1*	Différenciation & Développement, Croissance cellulaire & Prolifération, Migration & Motilité, MEC & Adhésion cellulaire, Voie de signalisation du TGFβ
AHNAK	1,4*	2,0*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT

BMP1	1,2	2,0*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Différenciation & Développement, Croissance cellulaire & Prolifération, MEC & Adhésion cellulaire, Voie de signalisation BMP
CALD1	1,6*	2,0*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Migration & Motilité
ITGAV	1,7*	2,0*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, MEC & Adhésion cellulaire, , Voie de signalisation des Intégrines
VIM	2,2*	1,9*	Gènes régulés positivement pendant l'EMT, Migration & Motilité, Cytosquelette
RGS2	-2,7*	-2,2*	Gènes régulés négativement pendant l'EMT, Récepteur couplé aux protéines G, Voie de signalisation des Récepteurs tyrosine kinase

Parmi les gènes régulés positivement par le TGFβ, il est intéressant de remarquer que les gènes associés à « la différenciation et au développement » (fig. 20A) et à « la croissance cellulaire et la prolifération » (fig. 20B) sont plus fortement induits par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique que dans les cellules huh9.13-cured contrôles.

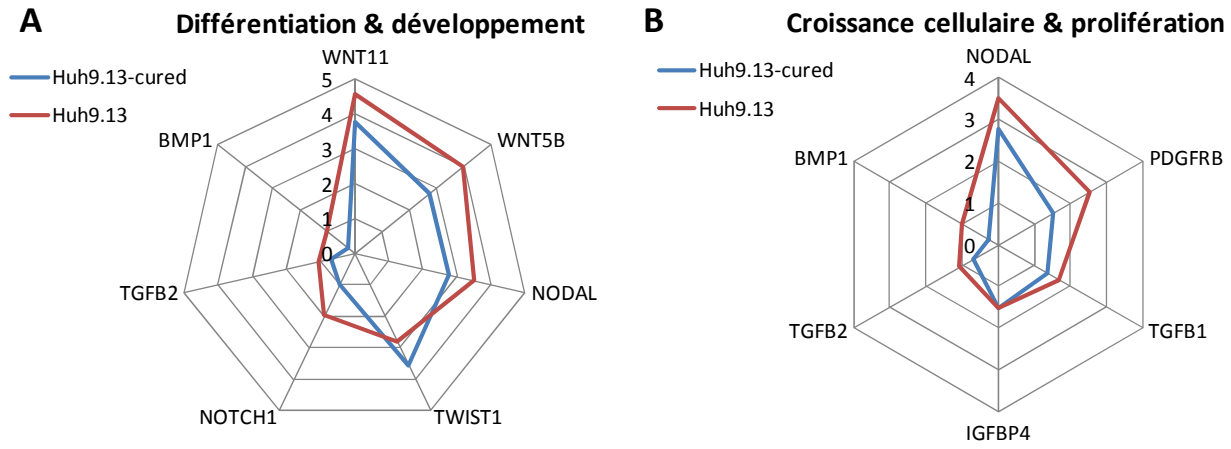


Figure 20 : Fold change induit par le TGFβ dans les deux lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured pour les gènes du PCR-array associés à « la différenciation et au développement » (A) et à « la croissance cellulaire et la prolifération » (B). Les valeurs présentées correspondent au log2(fold change).

Afin de compléter ces observations, nous avons voulu vérifier au niveau phénotypique si la stimulation TGFβ induit l'EMT dans les cellules Huh9.13 exprimant le réplicon subgénomique. Pour cela nous avons réalisé des marquages avec la phalloïdine-FITC. La phalloïdine est une toxine se liant aux filaments d'actine utilisée en microscopie afin de mettre en évidence la polymérisation des fibres d'actine, l'une des caractéristiques phénotypiques de l'induction d'EMT. Nous avons ainsi montré que le TGFβ induit une plus

forte polymérisation des fibres d'actine dans les cellules Huh9.13 exprimant le réplicon subgénomique que dans les cellules contrôles Huh9.13-cured (fig. 21A). Une quantification de la fluorescence a été réalisée sur huit photos pour chaque condition (fig. 21B) et a permis de confirmer que le TGFβ induit une plus forte polymérisation des fibres d'actine dans les cellules Huh9.13 comparé aux cellules Huh9.13-cured.

Nous pouvons donc conclure que dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, le TGFβ induit une plus forte expression de nombreux gènes reliés au processus d'EMT que dans les cellules contrôles et des changements phénotypiques caractéristiques de l'EMT.

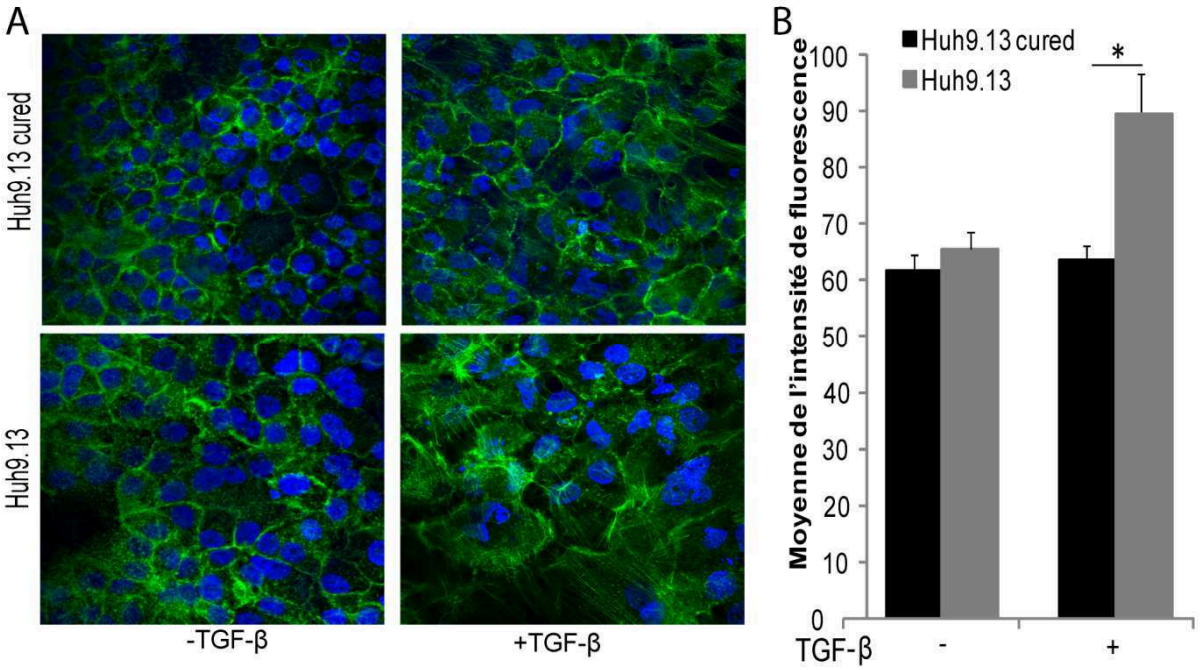


Figure 21 : Le TGFβ induit une plus forte polymérisation des fibres d'actine dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique. Après mise en culture sur lamelles de verre recouvertes de poly-D-lysine, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 48h avant le marquage avec la phalloïdine-FITC pour les fibres d'actine et une solution de Hoechst pour les noyaux. (A) Photographies de microscopie confocale (B) Moyenne des quantifications de fluorescence réalisées sur huit photographies par condition. Moyenne ± SE. * p<0,05 comparée aux cellules contrôles (test de Student).

2. L'expression de la protéine Smurf2 contrebalance l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ

a. Analyse de l'interactome centré sur Smurf2

L'interactome Homme/VHC réalisé au laboratoire a mis en évidence pour la première fois l'interaction entre la protéine virale NS3 et la protéine Smurf2. Les nombreuses fonctions de la protéine Smurf2 ont été détaillées dans le paragraphe II.3.e. Brièvement, la protéine Smurf2 est une E3-ubiquitine ligase qui joue un rôle important dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ en induisant la dégradation de Smad2 (Lin et al., 2000) et de TβRI (Kavsak et al., 2000), en mono-ubiquitinant Smad3 (Tang et al., 2011) et en influençant l'endocytose des récepteurs au TGFβ (Di Guglielmo et al., 2003). Afin d'étudier l'importance de la protéine Smurf2 dans l'effet du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ, nous avons commencé par construire un réseau d'interactions centré autour de Smurf2 (fig. 22) à partir des données disponibles dans VirHostNet (Navratil et al., 2009).

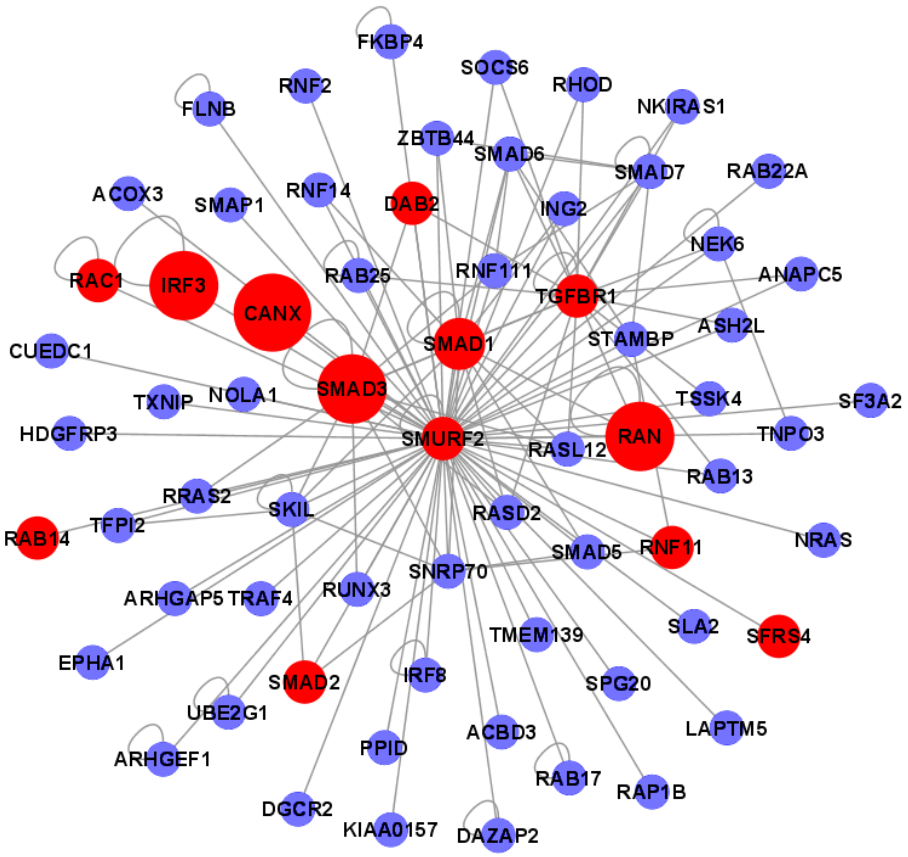


Figure 22 : Représentation graphique du réseau des interactions protéine-protéine centré sur la protéine Smurf2 montrant ses partenaires cellulaires directs. Les nœuds représentent les protéines cellulaires; les arêtes représentent les interactions entre protéines. Les nœuds rouges sont des protéines humaines ciblées par au moins une protéine virale. Le diamètre des nœuds est proportionnel au nombre de protéines virales ciblant la protéine cellulaire.

L'analyse de l'interactome de Smurf2 et de ses voisins protéiques a permis de mettre en évidence un ciblage important par les protéines virales. En effet, 12 des 66 voisins cellulaires de Smurf2 dans l'interactome humain sont ciblés par au moins une protéine virale résultant en un ciblage hautement significatif (valeur p = 2.25×10^{-4}, Exact Fischer test). Parmi ces douze protéines cellulaires, cinq sont ciblées par au moins une protéine du VHC (tableau 3), indiquant que le voisinage de Smurf2 est nettement ciblé par les protéines du VHC (valeur p = 0,002046, Exact Fischer test).

La mise en évidence de ce ciblage a renforcé notre intérêt pour la protéine Smurf2. Nous avons donc étudié l'impact de la surexpression et de l'extinction d'expression de cette protéine sur la réponse au TGFβ des cellules exprimant le réplicon subgénomique.

Tableau 3 : Liste des interactions entre les voisins de Smurf2 et les protéines virales ciblant l'interactome centré sur Smurf2

Protéine cellulaire	Protéine virale	Virus	PMID
CANX	**E1**	**VHC**	9557669 11602760
	E2	**VHC**	9557669
	US11	Herpes virus Humain 5 Souche Merlin	15215855
	fusion protein	Virus de la Rougeole	11765911
	Fusion protein (F)	Virus Respiratoire Syncytial	11765911
	NULL	Virus De La Stomatite Vésiculaire	7939687
DAB2	transforming protein	Papillomavirus Humain Type 16	16038965
IRF3	BGLF4	Herpes virus Humain 4 Type 1	19052084
	K9	Herpes virus Humain 8 Type P	11314014
	transforming protein	Papillomavirus Humain Type 16	15175323 9649509
	nucleocapside	Virus de la Rougeole Souche Edmonston-Zagreb	11907205
RAB14	**F**	**VHC**	16237761
RAC1	p40	Virus T-Lymphotropique Humain 1	14530271
RAN	Rep 78	Virus Adeno-Associé - 2	18971280
	E1A	Adénovirus Humain 5	16763564
	32 kD protein	Adénovirus Humain C	12649209
	transforming protein	Papillomavirus Humain Type 16	12649209
	antigène grand T	Virus Simien 40	12649209
RNF11	membrane protein	Virus de la Vaccine WR	19637933
SFRS4	Rep 78	Virus Adéno-Associé - 2	18971280
SMAD1	E1A	Adénovirus Humain Type 12	10497242
	inactive Cu-Zn superoxide dismutase-like in virion	Virus de la Vaccine WR	19637933

SMAD2	E1A	Adénovirus Humain Type 12	10497242
SMAD3	**core**	**VHC**	15334054 16007207
	NS3 protéase/hélicase	**VHC**	15334054
	E1A	Adénovirus Humain Type 12	10497242
	Tat	VIH 1	12758167 12202226
	transforming protein	Papillomavirus Humain Type 5	17020941
TGFBR1	**NS5A**	**VHC**	16407286

b. Impact de l'expression de Smurf2 sur la réponse des cellules au TGFβ

Nous avons commencé par étudier l'impact de la surexpression de Smurf2 sur l'expression de PAI-1, induite par le TGFβ dans les cellules exprimant ou non le réplicon subgénomique. La protéine Smurf2 ayant un rôle important dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ, nous avons travaillé avec des quantités de Smurf2 n'ayant pas d'impact sur la signalisation du TGFβ dans les cellules contrôles. Cela nous a permis

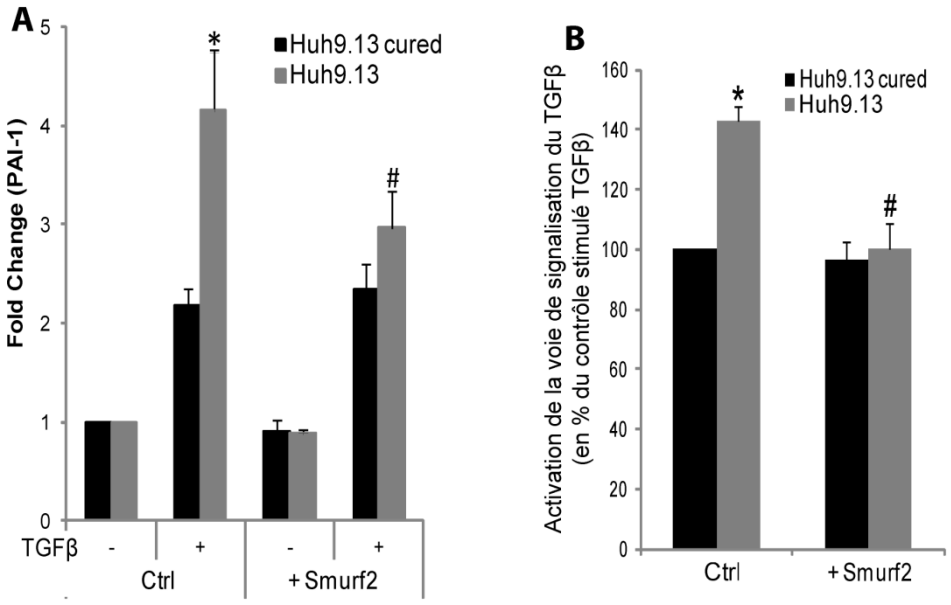


Figure 23 : La surexpression de Smurf2 inhibe l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la réponse des cellules au TGFβ. (A) Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été mises en plaque 24h avant d'être transfectées avec 50 ng du plasmide d'expression de Smurf2 ou un plasmide contrôle. 24h après la transfection, les cellules ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ ou avec le véhicule contrôle pendant 6h. L'expression de PAI-1 a été quantifiée par RT-PCR quantitative et normalisée par l'expression du gène de ménage GAPDH. Moyenne ± SE pour 4 expériences indépendantes. (B) Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été transfectées avec 50 ng plasmide d'expression de Smurf2 ou un plasmide contrôle et le système SBE-luciférase contenant un rapporteur firefly luciférase dont l'expression est dépendante d'un promoteur contenant des sites SBE et un rapporteur renilla luciférase dont l'expression est constitutive. 24h après, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ ou avec le véhicule contrôle pendant 6h avant la lyse et la lecture de luminescence. Les ratio firefly luciférase/renilla luciférase ont été normalisés par rapport aux cellules Huh9.13-cured stimulées par TGFβ (100%). Moyenne ± SE pour 4 expériences indépendantes.* p<0,05 comparé aux cellules contrôles, # p<0,05 comparé aux cellules Huh9.13 +TGFβ (test de Student).

d'étudier uniquement l'impact de la surexpression de Smurf2 sur l'effet du réplicon subgénomique. De manière très intéressante, la surexpression de Smurf2 diminue de manière significative l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur l'induction de PAI-1 par le TGFβ (fig. 23A).

L'effet du réplicon subgénomique sur la réponse des cellules au TGFβ peut aussi être étudié à l'aide d'un gène rapporteur luciférase dont le promoteur est sous la dépendance d'un enchainement de séquences SBE, l'élément de réponse aux protéines Smad (fig. 23B). Dans ce système nous avons mis en évidence que le réplicon subgénomique induit une plus forte expression du gène rapporteur SBE-luciférase après 6h de stimulation TGFβ comparé aux cellules contrôles Huh9.13-cured (fig. 23B). De plus, la surexpression de Smurf2 inhibe aussi l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur le rapporteur SBE-luciférase (fig. 23B).

Pour compléter ces observations, nous avons étudié l'impact de l'extinction d'expression

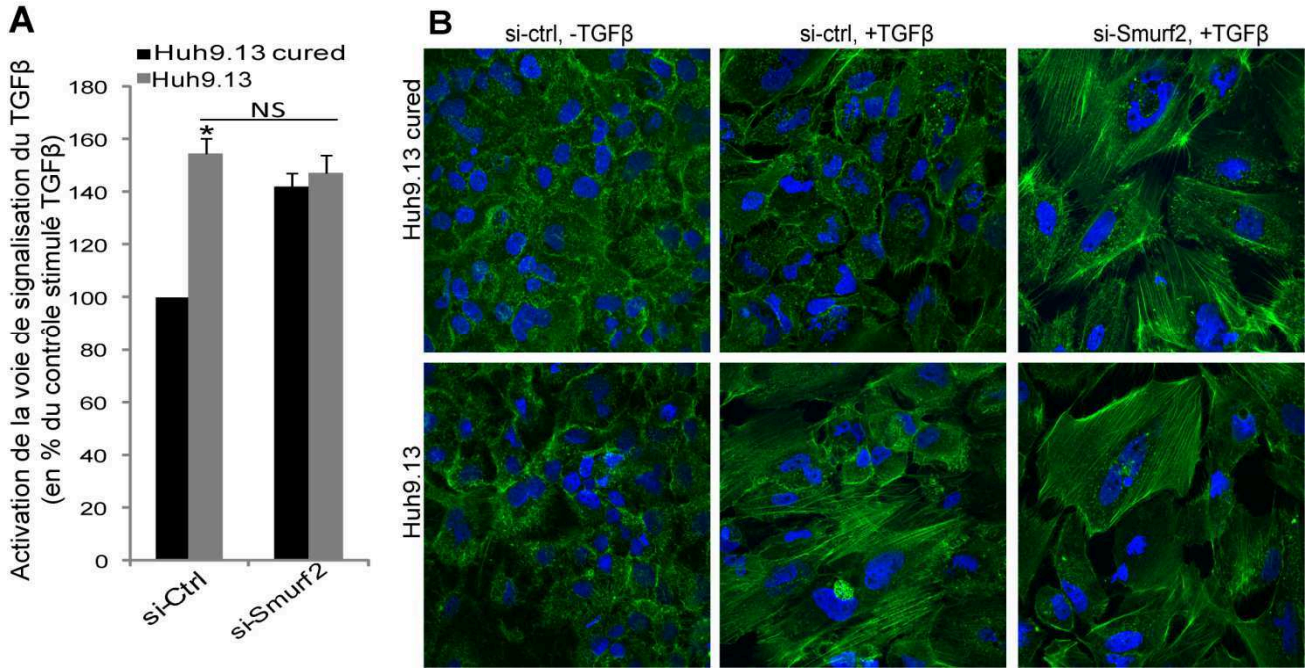


Figure 24 : L'extinction d'expression de Smurf2 mime l'effet amplificateur du réplicon subgénomique en présence du TGFβ.
(A) Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été cultivées sur lamelles de verre recouvertes de poly-D-lysine et transfectées 24h après avec le si-ARN contre Smurf2 ou le si-RNA contrôle. Les cellules ont été stimulées 24h après transfection avec 2,5 ng/mL de TGFβ ou avec le véhicule contrôle pendant 48h avant marquage par phalloïdine-FITC et solution de Hoechst.
(B) Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été mises en plaque et transfectées 24h après avec le si-ARN contre Smurf2 ou le si-RNA contrôle et le système rapporteur SBE-luciférase. 24h après transfection les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse et la lecture de luminescence. Les ratio firefly luciférase/renilla luciférase ont été normalisés par rapport aux cellules Huh9.13-cured stimulées par TGFβ (100%). Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.* p<0,05 comparé aux cellules contrôles (test de Student).

de Smurf2 sur l'activation de la voie de signalisation du TGFβ dans les cellules contrôles et dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique. Ces cellules ont été transfectées avec un si-ARN contre Smurf2, 24 heures avant la stimulation par le TGFβ. L'efficacité du si-RNA a été vérifiée par Western-blot (fig. 43). Dans les cellules contrôles Huh9.13-cured, l'extinction d'expression de Smurf2 par si-RNA conduit à une induction de l'expression du rapporteur SBE-luciférase après 6h de stimulation TGFβ (fig. 24A). Ce résultat est cohérent avec la fonction de Smurf2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ. De manière intéressante, l'extinction d'expression de Smurf2 n'a pas d'impact sur l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la transcription du rapporteur SBE-luciférase après 6h de stimulation TGFβ (fig. 24A). Nos résultats indiquent que l'extinction d'expression de Smurf2 dans les cellules contrôles Huh9.13-cured mime l'effet amplificateur du réplicon subgénomique. De manière similaire dans les cellules contrôles Huh9.13-cured n'exprimant pas la protéine Smurf2, une forte polymérisation des fibres d'actine est observée (fig. 24B). Cette polymérisation est comparable à celle induite par le réplicon subgénomique dans les cellules Huh9.13 avec le si-ARN contrôle (fig. 24B). De plus, aucun effet additif n'est observé dans les cellules Huh9.13 n'exprimant pas Smurf2 (fig. 24B).

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la protéine Smurf2 et le réplicon subgénomique ont des effets antagonistes sur la voie de signalisation du TGFβ et suggère que le réplicon subgénomique inactive la fonction de Smurf2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ.

c. Le réplicon subgénomique n'augmente pas le TGFβ actif présent dans le milieu

Comme indiqué dans l'introduction, paragraphe II.5.a, , il a été décrit dans la littérature que l'expression des protéines virales induit la synthèse et l'activation du TGFβ (Presser et al., 2011; Schulze-Krebs et al., 2005). Nous avons donc déterminé si, dans nos conditions, le

réplicon subgénomique induit la synthèse et l'activation de TGFβ. Un dosage du TGFβ actif présent dans le milieu de culture des cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured a donc été réalisé (fig. 25). Pour cela nous avons utilisé des surnageants de culture récoltés 30h après la mise en culture des cellules c'est-à-dire au même moment que la lyse des cellules dans les expériences de PCR-quantitative. Le dosage a été réalisé à partir des surnageants bruts sans traitement préalable afin de doser uniquement le TGFβ actif et non pas le TGFβ latent présent en grande quantité dans le sérum utilisé en culture cellulaire. Ce dosage a été validé par un contrôle positif réalisé par dilution d'une quantité connue de TGFβ dans le milieu de culture des cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured. Ce contrôle nous a permis de confirmer que cette analyse permettait de doser uniquement le TGFβ puisque la concentration finale calculée correspond à la concentration initiale en TGFβ.

Les résultats du dosage montrent que dans nos conditions d'expériences, l'expression du réplicon subgénomique n'induit pas d'augmentation du TGFβ actif dans le milieu comparé aux cellules contrôles Huh9.13-cured. L'augmentation de la réponse des cellules au TGFβ en présence du réplicon subgénomique n'est donc pas due à une augmentation de la synthèse et de l'activation du TGFβ.

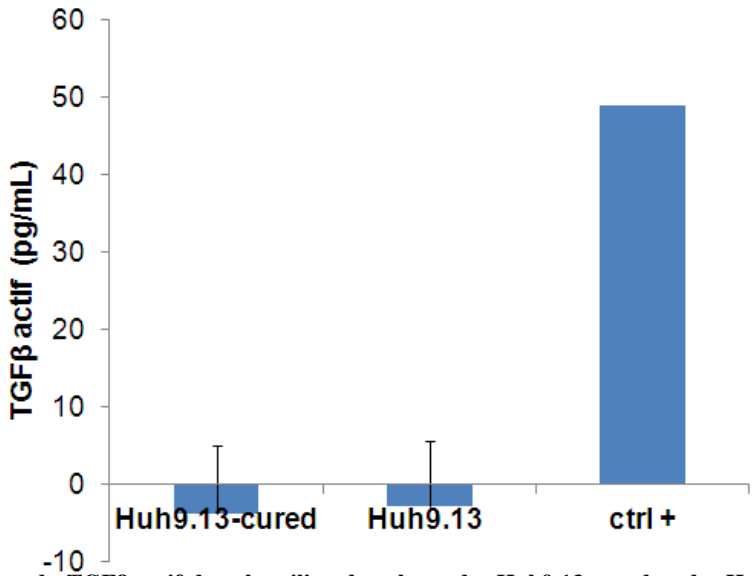


Figure 25 : Dosage du TGFβ actif dans le milieu de culture des Huh9.13-cured et des Huh9.13. 24h après la mise en culture des cellules, le véhicule contrôle du TGFβ a été ajouté (conditions comparables aux autres expériences) et 6h après les surnageants ont été récoltés. Le dosage du TGFβ actif a été effectué par Elisa. Moyenne pour 5 puits ± SE

II. Le ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC

1. Introduction

Après avoir mis en évidence que le réplicon subgénomique du VHC augmente la réponse des cellules au TGFβ, nous avons étudié plus en détails les interactions pouvant avoir lieu entre les protéines du VHC et les protéines de la voie de signalisation du TGFβ afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués. Nous nous sommes focalisés sur les acteurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ : Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, Smurf1 et Smurf2. En 2008, au début de ce travail plusieurs interactions étaient déjà connues entre ces protéines et des protéines virales : l'interaction entre Smad3 et certains variants de la protéine Core (Cheng et al., 2004; Pavio et al., 2005) et l'interaction entre Smad3 et la protéine NS3 (Cheng et al., 2004). Afin d'étudier les interactions directes entre les protéines de la voie de signalisation du TGFβ et les protéines virales, deux technologies ont été utilisées : le double hybride chez la levure et la co-immunoprécipitation en cellules humaines. Le double hybride a permis de tester toutes les interactions deux à deux, puis nous nous sommes concentrés sur les protéines virales intéressantes pour la co-immunoprécipitation. Nous avons étudié l'ensemble des protéines virales du VHC de la souche con1, et pour certaines d'entre elles leurs domaines protéiques. Toutes les ORF de ces protéines et de leurs domaines étaient disponibles dans ViralORFeome au laboratoire (Pellet et al., 2010). Pour les ORF cellulaires, celles de Smad3 et Smad4 étaient disponibles au laboratoire dans le hORFéome v3.1. Celles de Smad2 et Smad7 nous ont gracieusement été données par Y. Jacob (Institut Pasteur GPCH, Paris). Les ORF de Smurf1 et Smurf2 ont été achetées à Life Technologies et Addgene (plasmide 13504 (Kavsak et al., 2000)) respectivement. Hormis l'ORF de Smurf2, toutes les

ORF étaient disponibles en pDONR (compatible avec le système Gateway). Le clonage de Smurf2 en pDONR a été fait au laboratoire.

Les ORF virales et cellulaires ont été vérifiées par séquençage.

2. Résultats

a. La protéine NS3 cible les acteurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ chez la levure

Les interactions directes entre la voie de signalisation du TGFβ et les protéines virales du VHC ont été testées deux à deux dans des matrices d'interactions réalisées chez la levure permettant ainsi l'étude de 78 interactions.

La technique de double hybride chez la levure S. *cerevisiæ* permet d'identifier les interactions entre deux protéines en s'appuyant sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4. Celui-ci est composé de deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN (GAL4DB), en fusion avec les protéines virales dans notre cas et un domaine d'activation de la transcription (GAL4AD), en fusion avec les protéines cellulaires. S'il y a interaction entre la protéine virale et la protéine humaine le facteur de transcription Gal4 est reconstitué et fonctionnel, ce qui permet ainsi la transcription du gène *HIS3*. Les levures deviennent alors capables de métaboliser l'histidine et donc de proliférer sur un milieu sans histidine. L'utilisation du 3-AT (de 5 mM à 20 mM), un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3, a permis de déterminer les interactions les plus robustes. Le tableau 4 récapitule toutes les interactions testées et présente les résultats obtenus.

Tableau 4 : Bilan des interactions étudiées entre la voie de signalisation du TGFβ et les protéines virales.

	Core	E1	E2	NS2	NS3	NS3p	NS3h	NS4A	NS4B	NS5A	NS5A-mb	NS5B	NS5B-mb
Smad2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad3	neg	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad4	neg	ND	ND	ND	neg	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad7	neg	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smurf1	neg	neg	neg	neg	**pos**	**pos**	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smurf2	neg	neg	neg	neg	**pos**	**pos**	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg

Neg : pas d'interaction mise en évidence, ND : interaction non déterminée, TA : trans-activation de la protéine virale, pos : interaction identifiée entre la protéine virale et la protéine cellulaire. NS3p : domaine protéase de NS3, NS3h : domaine hélicase de NS3, NS5A-mb, NS5B-mb : NS5A ou NS5B sans le domaine membranaire.

Ces matrices de double hybride ont permis de mettre en évidence que NS3 ciblait particulièrement la voie de signalisation du TGFβ. En effet, nous avons confirmé l'interaction, déjà connue de la littérature, entre NS3 et Smad3 (Cheng et al., 2004) et nous avons identifié trois autres interactions entre NS3 et Smad7, Smurf1 et Smurf2 (fig. 26, tab. 4). L'interaction de NS3 avec les protéines Smurf implique le domaine protéase de NS3 (fig. 26). De plus ces interactions sont les plus robustes, puisque ce sont les seules interactions qui résistent à l'ajout de 15 mM de 3-AT dans le milieu sélectif (fig. 26).

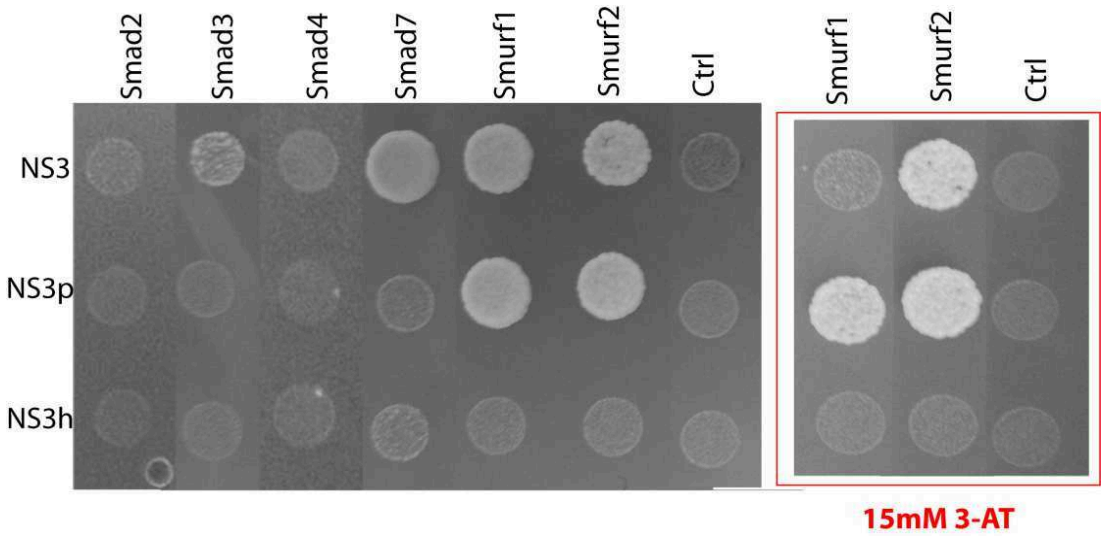


Figure 26 : Matrice double hybride chez la levure pour la protéine virale NS3. Après sélection des levures exprimant la protéine virale et la protéine cellulaire (diploïdes), les levures ont été mises à proliférer sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine. Les levures qui prolifèrent sont celles où il y a interaction entre la protéine cellulaire et la protéine virale. L'ajout de 3-4AT dans le milieu sélectif permet d'identifier les interactions les plus robustes. Le 3-AT est un inhibiteur compétitif de l'enzyme His 3
NS3p : NS3 protéase, NS3h : NS3 hélicase.

b. NS3 et NS3-4A interagissent avec Smad2, Smad3 et Smurf2 en cellules humaines

Une fois que nous avons mis en évidence que NS3 cible particulièrement la voie de signalisation du TGFβ, nous avons étudié en cellules humaines par co-immunoprécipitation les interactions entre NS3 et les protéines intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ. En effet, il est nécessaire de confirmer les interactions identifiées chez la levure en cellules humaines car les modifications post-traductionnelles des protéines sont différentes entre les deux organismqes.

Comme indiqué dans l'introduction, paragraphe I.2.b, dans les cellules infectées comme dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, la protéine virale NS3 s'associe avec son cofacteur NS4A pour former une protéase active. Cette liaison entraîne des changements de conformation pour la protéine NS3. C'est pourquoi dans les cellules humaines nous avons travaillé avec l'ORF de NS3 mais aussi avec l'ORF de NS3-4A. Dans cette construction, le peptide de NS4A, co-facteur de l'activité protéase de NS3, est fusionné à NS3 du coté N-terminal. Cette construction permet l'expression d'une protéine NS3-4A ayant une forte activité protéasique (Thibeault et al., 2009).

Les co-immunoprécipitations ont été réalisées en cellules humaines 293T. Ces cellules ont été co-transfectées avec les protéines virales (étiquette GST) et les protéines de la voie de signalisation du TGFβ (étiquette flag). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lysées et l'immunoprécipitation réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-flag.

Les co-immunoprécipitations ont permis de mettre en évidence qu'en cellules humaines, NS3 interagit avec Smad2, Smad3 et Smurf2 (fig. 27). Une faible interaction a aussi été détectée entre NS3 et Smurf1 (fig. 27). Concernant la protéine NS3-4A nous avons obtenu un profil d'interactions tout à fait similaire à celui obtenu avec la protéine NS3 (fig. 27).

L'interaction entre NS3 et Smad7 identifiée chez la levure n'a pas été retrouvée en cellules de mammifère.

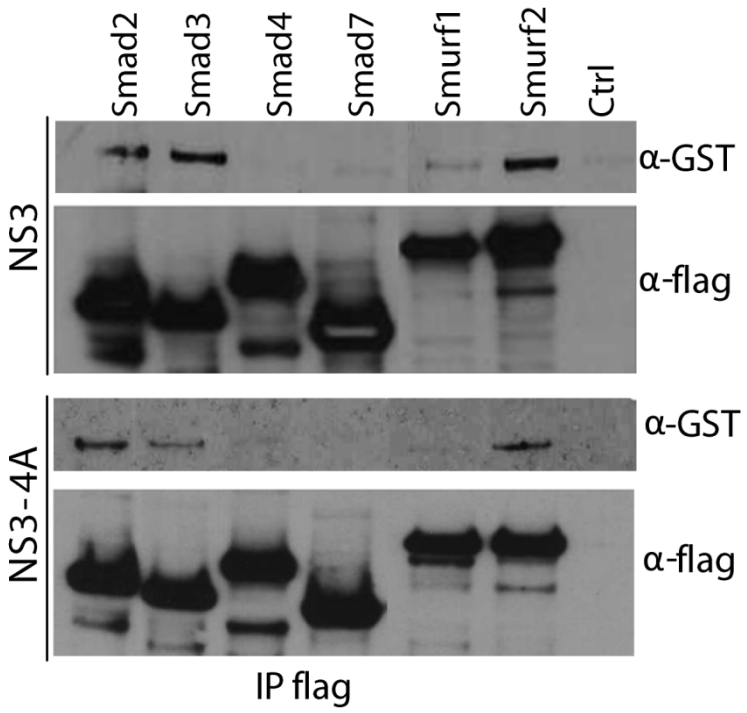


Figure 27 : Co-immunoprécipitation en cellules 293T. Les cellules 293T ont été transfectées avec les protéines virales (étiquette GST) et les protéines humaines (étiquette 3Xflag). 48h après transfection, les cellules ont été lysées et les lysats cellulaires immunoprécipitées à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-flag. Les interactions ont été identifiées par WB avec un anticorps anti-GST.

3. Conclusion

L'étude des interactions directes entre les protéines intracellulaires de la voie de signalisation du TGFβ et les protéines virales a permis de montrer que les protéines virales NS3 et NS3-4A ciblent particulièrement la voie de signalisation du TGFβ. Pour conclure, deux interactions de NS3 ont été identifiées par les deux techniques utilisées, avec Smad3 et Smurf2. En cellules humaines nous avons mis en évidence que ces interactions avaient lieu avec la protéine NS3 mais aussi avec la protéase NS3-4A. Comme indiqué dans le paragraphe d'introduction, l'interaction entre NS3 et Smad3 était déjà connue de la littérature (Cheng et al., 2004). Dans ce travail réalisé par Cheng *et al*, aucune interaction n'a été identifiée en cellules humaines entre Smad2 et NS3. Dans nos expériences de co-immunoprécipitation

nous avons mis en évidence une interaction entre Smad2 et NS3. Au vu de l'homologie importante entre Smad2 et Smad3 il n'est pas surprenant de trouver des profils d'interactions similaires pour ces deux protéines.

L'interaction entre la protéine virale NS3 et Smurf2 avait été mise en évidence lors des cribles doubles hybrides réalisées au sein du laboratoire (De Chassey et al., 2008). Dans ce travail nous avons montré l'implication du domaine protéase de NS3 dans l'interaction avec la protéine Smurf2 (fig. 26). De plus l'utilisation de l'inhibiteur compétitif de l'enzyme His3, le 3-AT, nous a permis de mettre en évidence que les interactions de Smurf2 avec NS3 et avec son domaine protéase sont particulièrement robustes (fig. 26). L'interaction entre Smurf2 et NS3 a été confirmée en cellules humaines et nous avons montré pour la première fois que Smurf2 interagissait avec la protéase active NS3-4A (fig. 27). L'interaction de Smurf2 avec la protéase NS3-4A est particulièrement intéressante au vu des résultats obtenus dans les cellules Huh9.13 lors de la surexpression ou de l'extinction d'expression de Smurf2.

L'interaction entre la protéine Core et la protéine Smad3, déjà connue de la littérature (Cheng et al., 2004; Pavio et al., 2005), n'a pas été retrouvée lors de nos matrices de doubles hybrides chez la levure. Différentes raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord la protéine Core est une protéine hydrophobe, ce qui rend difficile l'identification d'interactions en double hybride. De plus, dans l'étude réalisée par Pavio *et al.*, il a été montré que l'interaction ne se faisait qu'avec les variants de la protéine Core provenant d'une zone tumorale et non avec les variants provenant d'une zone non tumorale (Pavio et al., 2005). Les différents variants de séquence de Core ne possèdent donc pas tous la propriété de se lier à Smad3. Dans ce travail, nous avons utilisé la séquence consensus de la protéine Core pour le

génotype 1b du VHC qui ne possède pas les mutations observées dans la protéine Core issue des tumeurs de patients (Pavio et al., 2005).

Les interactions identifiées dans ce travail étendent et renforcent les résultats de l'interactome Homme/VHC (De Chassey et al., 2008) montrant un important ciblage de la voie de signalisation du TGFβ illustré dans la figure 28.

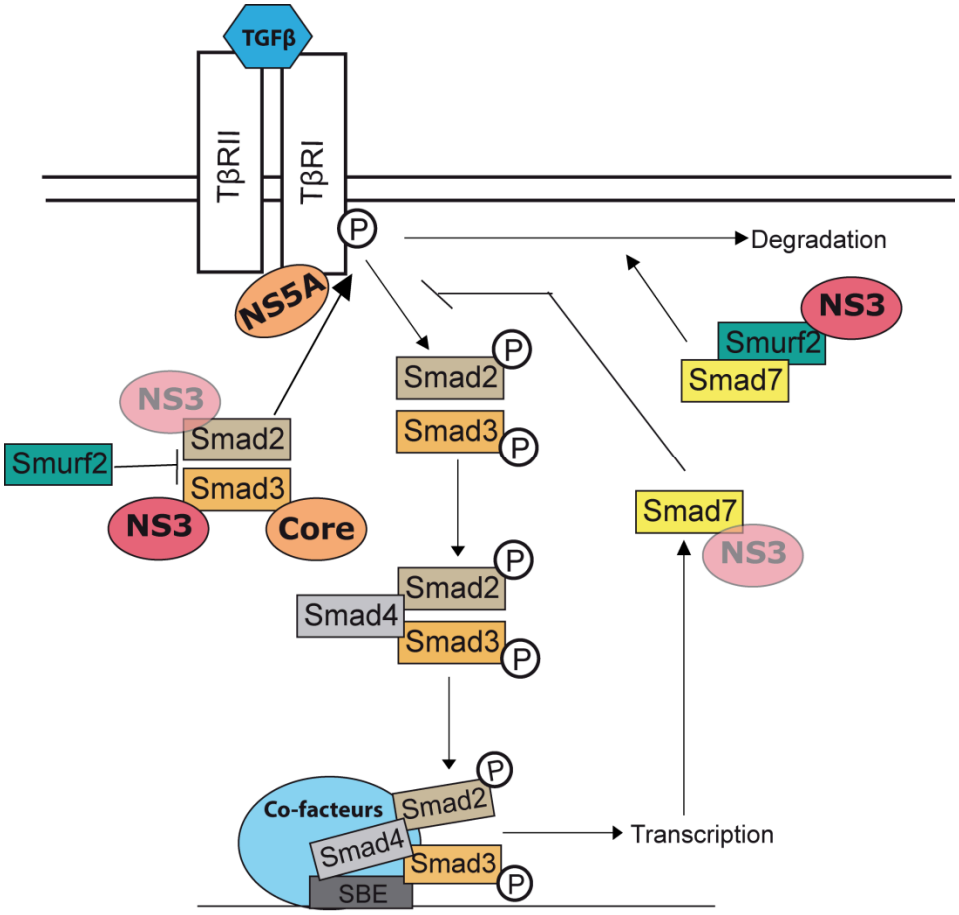


Figure 28 : Ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines du VHC. Les interactions identifiées dans ce travail par deux méthodes sont en rouge foncé, les interactions identifiées par une seule des deux méthodes en rouge clair et les interactions connues de la littérature en orange.

III. L'expression de NS3-4A augmente la réponse des cellules au TGFβ

1. Impact de l'expression de NS3-4A sur la réponse des cellules au TGFβ

a. Objectifs

Suite à la mise en évidence du ciblage de la voie de signalisation du TGFβ par les protéines virales NS3 et NS3-4A, nous avons étudié l'impact de l'expression de ces protéines sur la voie de signalisation du TGFβ.

b. La protéine NS3-4A augmente la transcription des gènes cibles du TGFβ

Dans un premier temps nous avons étudié l'impact des protéines virales NS3 et NS3-4A sur l'induction du gène rapporteur SBE-luciférase après 6h de stimulation par le TGFβ. Nous avons travaillé dans des cellules Huh7 transfectées avec le plasmide d'expression pour la protéine virale ou un plasmide contrôle.

Nous avons ainsi mis en évidence que l'expression de NS3-4A induit, de manière similaire au réplicon subgénomique, une plus forte réponse des cellules au TGFβ mesurée avec le gène rapporteur SBE-luciférase (fig. 29A). L'expression de la protéine NS3 tend aussi à induire une augmentation de l'expression du gène rapporteur sans que son effet soit significatif. Nous avons voulu étudier l'implication de l'activité protéasique de NS3-4A dans son effet amplificateur de la réponse au TGFβ. Pour cela nous avons travaillé avec le mutant du site actif de la protéase NS3-4A-S139A, dépourvu d'activité protéasique. L'expression de ce mutant augmente la réponse au TGFβ de façon similaire à celle de NS3-4A non muté (fig. 29A). De plus, le traitement des cellules par un inhibiteur de l'activité protéasique de NS3-

4A, le BILN2061 (Llinàs-Brunet et al., 2004), ne modifie pas significativement l'effet de NS3-4A sur l'expression du rapporteur (fig. 29B). Nous avons ainsi mis en évidence que l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation ne dépendait pas de son activité protéasique puisque le mutant a le même impact que NS3-4A et que l'inhibiteur de l'activité protéasique de NS3-4A n'a pas d'impact significatif.

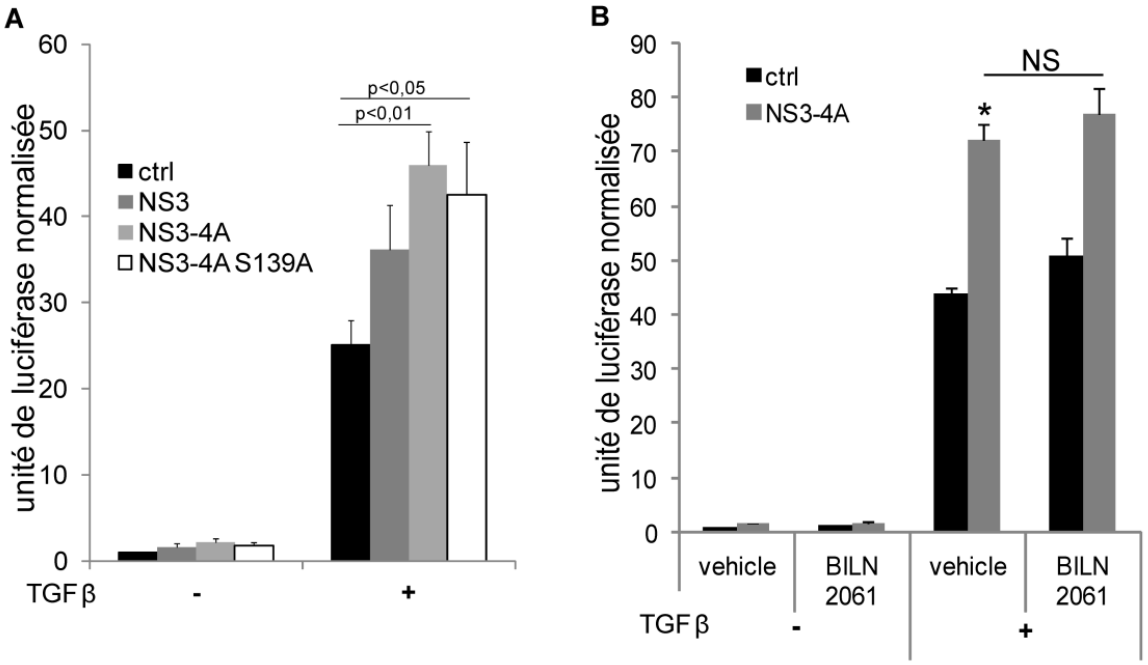


Figure 29 : NS3-4A amplifie la signalisation du TGFβ. Les cellules Huh7 ont été transfectées avec les plasmides d'expression pour les différentes ORF virales ou un plasmide contrôle (Ctrl) et avec le rapporteur SBE-luciférase. 24h après transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse des cellules et la lecture de luminescence (A). Les cellules ont été pré-traitées avec 1µM de BILN2061 avant la stimulation par le TGFβ (B). Les graphiques montrent la moyenne ± SE pour 5 (A) ou 3 (B) expériences indépendantes. (* p<0,05, test de Student)

L'impact de ces trois protéines virales a aussi été étudié dans des cellules non hépatiques. Ainsi, nous avons montré que dans des cellules HEK293T, l'expression de NS3-4A induit aussi une plus forte réponse des cellules au TGFβ et cet effet amplificateur est indépendant de l'activité protéasique de NS3-4A (données non montrées).

L'expression du rapporteur SBE-luciférase dépend d'un promoteur constitué de la répétition de sites consensus de liaison des Smad. Nous avons donc voulu confirmer l'impact de NS3-4A sur l'expression de deux gènes cibles caractéristiques de la réponse au TGFβ :

PAI-1 et Smad7. Nous avons déjà mis en évidence que le réplicon subgénomique induit une plus forte expression de PAI-1 après stimulation TGFβ. Pour réaliser cette analyse par PCR quantitative, il était important de comparer deux lots de cellules homogènes, exprimant ou non la protéine NS3-4A. Le vecteur d'expression de NS3-4A porte un gène de résistance au G418 ce qui nous a permis après transfection, de sélectionner les cellules Huh7 exprimant NS3-4A, NS3-4A-S139A ou un peptide contrôle, en les traitant par 1 mg/mL de G418. La protéine NS3-4A étant une protéase active son expression est délétère pour les cellules, ce qui nous a empêché d'obtenir des lignées stables.

De manière tout à fait similaire aux résultats obtenus avec le réplicon subgénomique, nous avons mis en évidence que l'induction de PAI-1 par le TGFβ était augmentée dans les cellules exprimant NS3-4A comparé aux cellules contrôles (fig. 30A). L'induction

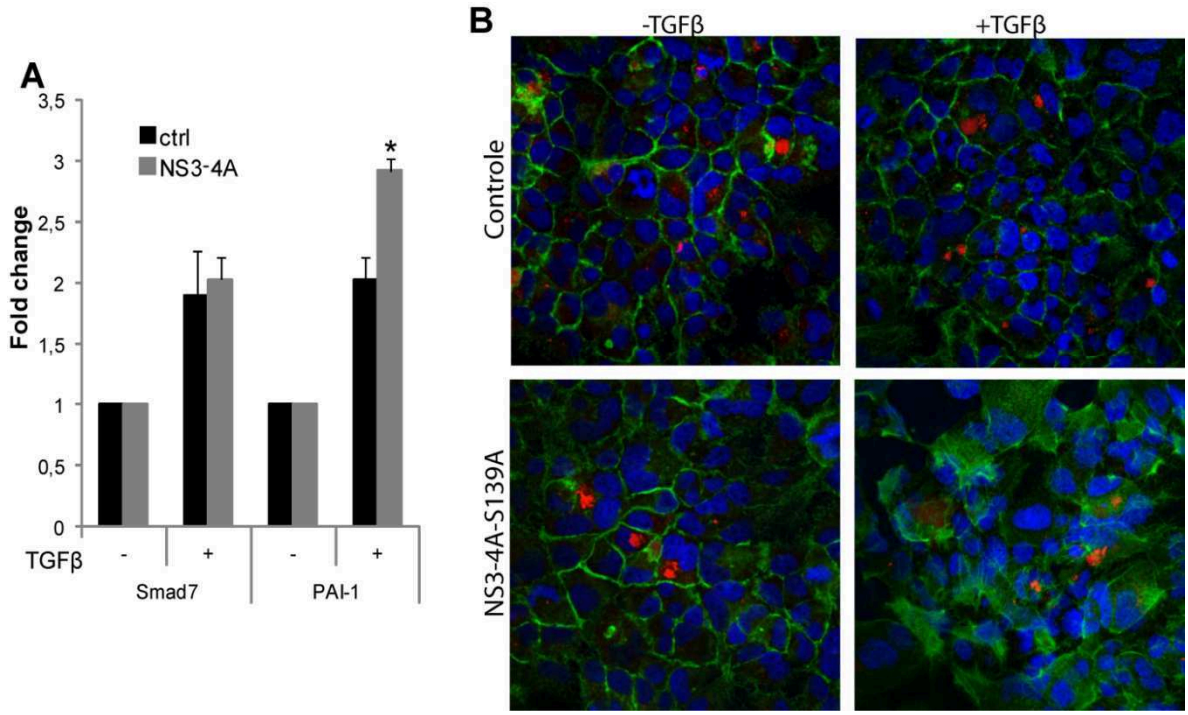


Figure 30 : NS3-4A augmente l'expression de PAI-1 et la polymérisation des fibres d'actine induites par le TGFβ. (A) les cellules Huh7 exprimant un peptide contrôle ou NS3-4A ont été mises en plaque 24h avant d'être stimulées apar 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h. Après extraction des ARN totaux et traitement à la DNase, l'expression de Smad7 et PAI-1 a été quantifiée par PCR quantitative. Les résultats ont été analysés en regard des cellules non stimulées pour chaque lignée (fold change) après normalisation par la GAPDH. * p<0,05 comparé aux cellules contrôle (test de Student). (B) Les cellules Huh7 exprimant un peptide contrôle ou NS3-4A-S139A ont été mises en culture sur des lamelles de verre recouvertes de poly-D-lysine. 24h après les cellules ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 24h avant marquage des fibres d'actine par la phalloïdine-FITC de NS3-4A par un anticorps anti-flag-Cy3 et des noyaux par une solution de Hoechst.

d'expression de Smad7 par le TGFβ n'est pas modifiée par l'expression de la protéase NS3-4A (fig. 30A). La plus forte induction de PAI-1 dans les cellules exprimant la protéine NS3-4A pourrait être liée à l'induction d'EMT par le TGFβ dans ces cellules. C'est pourquoi nous avons analysé l'impact de la protéine NS3-4A sur la polymérisation des fibres d'actine induite par le TGFβ. Nous avons travaillé avec les cellules exprimant la protéine NS3-4A mutée car l'impact de la protéine est identique sur la voie de signalisation du TGFβ et l'expression de NS3-4A S139A est moins toxique pour les cellules. Nous avons ainsi montré que les cellules exprimant la protéine NS3-4A mutée présentent une plus forte polymérisation des fibres d'actine après 24h de stimulation par le TGFβ comparé aux cellules contrôles (fig. 30B).

Ainsi, tout comme le réplicon subgénomique, l'expression de la protéine NS3-4A favorise la formation de fibres d'actine en réponse au TGFβ, qui est l'une des caractéristiques phénotypiques de l'EMT.

c. Impact de la protéine NS3-4A sur la phosphorylation des protéines R-Smad

La signalisation du TGFβ commence par l'activation du complexe de récepteurs TβRII-TβRI qui phosphoryle ensuite les protéines R-Smad : Smad2 et Smad3. Afin d'étudier l'impact de la protéine NS3-4A sur l'activation de cette voie de signalisation, nous avons, dans un premier temps, travaillé avec un inhibiteur de TβRI, le SB431542. Cette molécule est un inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase du récepteur. Dans les cellules transfectées avec le plasmide contrôle, le traitement préalable des cellules avec cet inhibiteur avant la stimulation par le TGFβ supprime toute induction du gène rapporteur SBE-luciférase (fig. 31). Nous avons obtenu le même résultat dans les cellules exprimant NS3-4A démontrant ainsi que l'effet amplificateur de NS3-4A dépend de l'activation du TβRI par le TGFβ et ne dépend pas de l'activation d'autres voies de signalisation par le TGFβ (fig. 31).

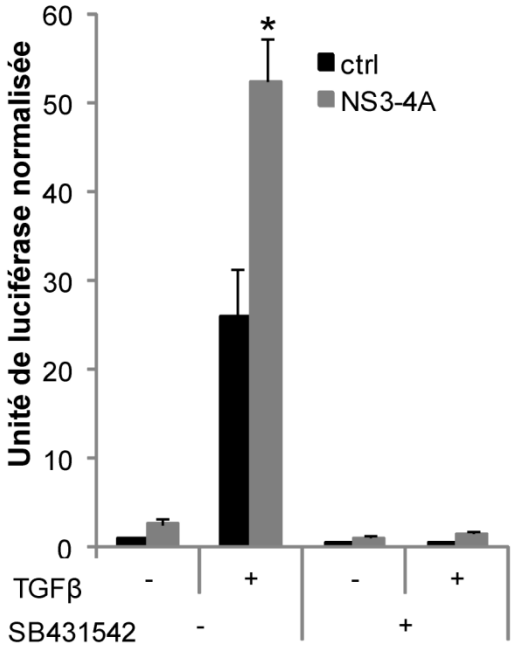


Figure 31 : L'effet amplificateur de NS3-4A dépend de l'activation de TβRI. Les cellules Huh7 ont été mises en culture 24h avant la transfection avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle. 24h post-transfection, les cellules ont été traitées ou non avec 10 µM de SB431542 pendant 15min avant la stimulation avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h. Les cellules ont ensuite été lysées avant la lecture de luminescence. Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.

Après avoir mis en évidence que l'effet amplificateur de NS3-4A dépend de l'activation de TβRI, nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, à la phosphorylation des protéines R-Smad. Le niveau de phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 a donc été analysé après stimulation par le TGFβ (fig. 32A). Dans les cellules Huh7 contrôles, le pic de phosphorylation des R-Smad a lieu environ 30 minutes après l'ajout de TGFβ (fig. 32B et C) tandis que dans les cellules exprimant NS3-4A la phosphorylation des protéines R-Smad induite par le TGFβ se maintient après 30 minutes et persiste au moins jusqu'à 3 heures après la stimulation par le TGFβ (fig. 32B et C). De plus, après une heure de stimulation TGFβ, le niveau de phosphorylation est plus élévé dans les cellules exprimant NS3-4A que dans les cellules contrôles (fig. 32B et C).

Ces résultats montrent donc que l'expression de la protéine NS3-4A augmente et stabilise la phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 induite par le TGFβ conduisant à une plus forte réponse des cellules au TGFβ.

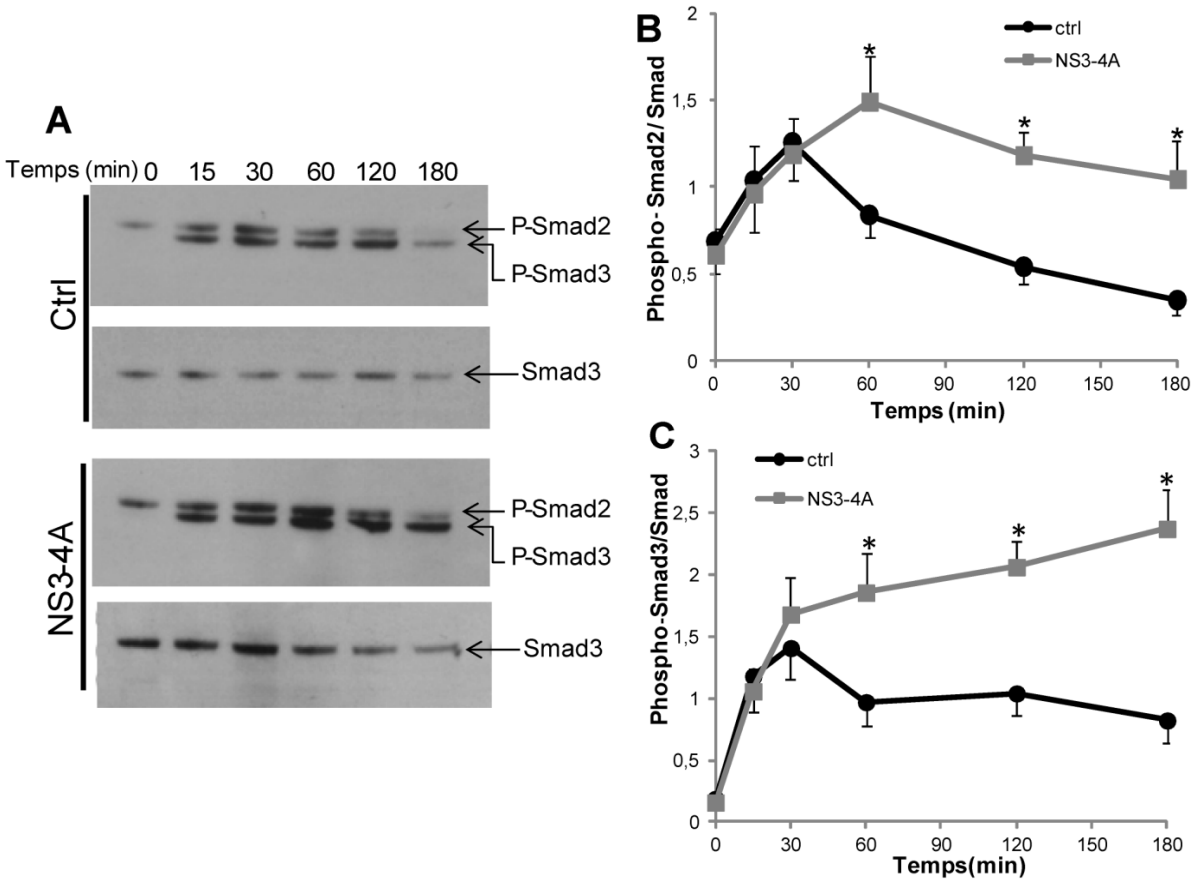


Figure 32 : La protéine NS3-4A augmente et stabilise la phosphorylation des protéines R-Smad. Les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle. 24h après les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant les temps indiqués. Les protéines Phospho-Smad2/3 et Smad3 ont été détectées par WB (A). Après quantification des signaux, la moyenne ± SE des ratios Phospho-Smad/Smad pour 4 à 6 expériences est rapportée (B, C). * p<0,05, test de Student.

2. La protéine Smurf2 influence l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ

a. Objectifs

Nous avons précédemment montré que Smurf2 et le réplicon subgénomique ont des rôles antagonistes sur la signalisation du TGFβ. La protéine NS3-4A est capable d'interagir avec la protéine Smurf2 en cellules humaines et cette protéine virale amplifie la signalisation du TGFβ dans les cellules Huh7. C'est pourquoi, nous avons analysé les effets de Smurf2 sur l'amplification de la signalisation du TGFβ en présence de NS3-4A. Pour cela nous avons

étudié l'impact de doses croissantes de Smurf2 et de l'extinction d'expression de Smurf2 sur la voie de signalisation du TGFβ.

b. NS3-4A et Smurf2 ont des rôles antagonistes sur la voie de signalisation du TGFβ

Tout d'abord nous avons étudié l'impact de doses croissantes de Smurf2 sur l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ. Comme indiqué précédemment nous avons travaillé avec de faibles doses de Smurf2 afin de limiter l'impact de Smurf2 sur l'activation basale de la voie de signalisation et d'étudier uniquement l'impact de la protéine Smurf2 sur l'effet amplificateur de NS3-4A. Nous avons ainsi mis en évidence

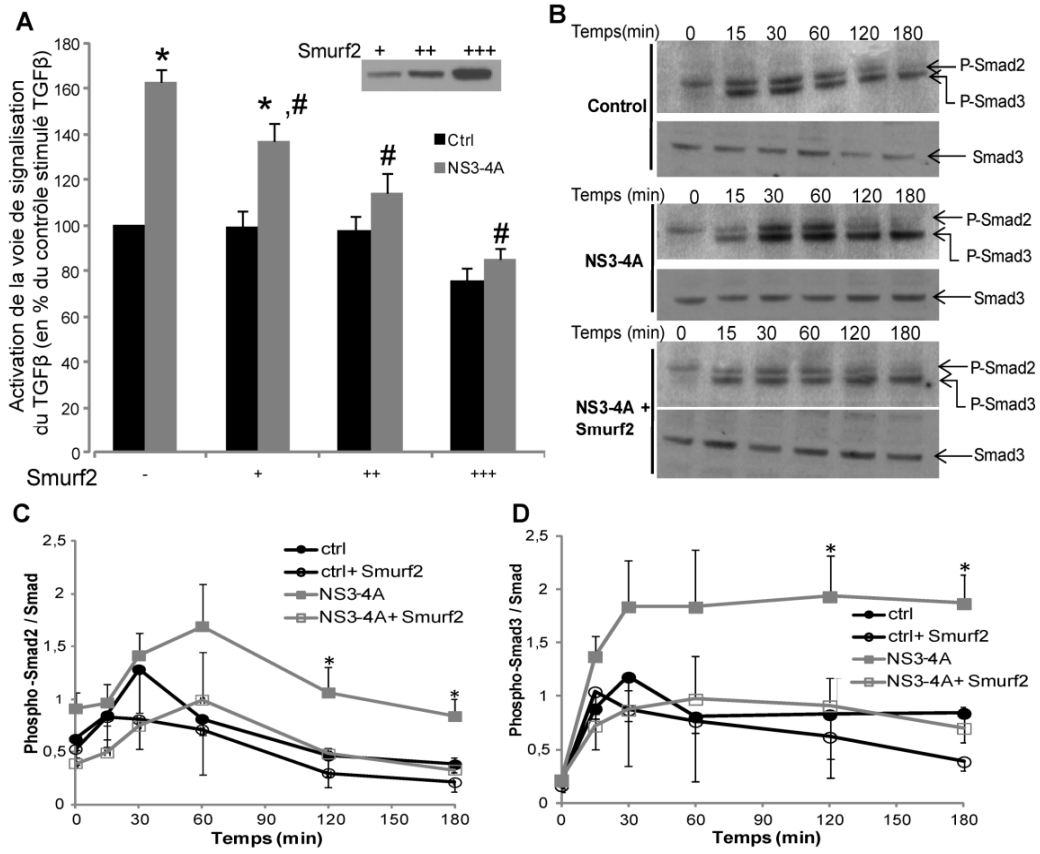


Figure 33 : La surexpression de Smurf2 inhibe l'effet amplificateur de NS3-4A. (A) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec les plasmides d'expression pour NS3-4A ou un plasmide contrôle, avec des doses croissantes de Smurf2, et avec le rapporteur SBE-luciférase. 24h après transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse des cellules et la lecture de luminescence. Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.* p<0,05 comparé aux cellules contrôles, # p<0,05 comparé à NS3-4A +TGFβ (test de Student). (B-D) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle et Smurf2. 24h après les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant les temps indiqués. Les protéines Phospho-Smad2/3 et Smad3 ont été détectées par WB (B). Après quantification des signaux, la moyenne ± SE des ratios Phospho-Smad/Smad pour 3 expériences est rapportée (C, D). * p<0,05, test de Student.

que l'expression de doses croissantes de la protéine Smurf2 abroge progressivement l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ sans avoir d'impact dans les cellules contrôles (fig. 33A). Nous avons pu observer que l'expression de NS3-4A n'influence pas le niveau d'expression de la protéine Smurf2. La surexpression de la protéine Smurf2 inhibe aussi l'augmentation et la stabilisation de phosphorylations des protéines R-Smad induites par NS3-4A (fig. 33B-D) sans avoir d'impact sur la phosphorylation des protéines R-Smad dans les cellules contrôles. La surexpression de Smurf2 contrecarre complètement les effets de la protéase NS3-4A.

Enfin nous avons analysé l'impact de l'extinction d'expression de Smurf2 par si-ARN. De manière similaire aux résultats obtenus dans les Huh9.13-cured, l'extinction d'expression de Smurf2 dans les cellules Huh7 contrôles conduit à une augmentation de la signalisation du TGFβ qui mime l'effet amplificateur de NS3-4A (fig. 34). De plus NS3-4A n'a pas d'effet supplémentaire sur la signalisation du TGFβ (fig. 34).

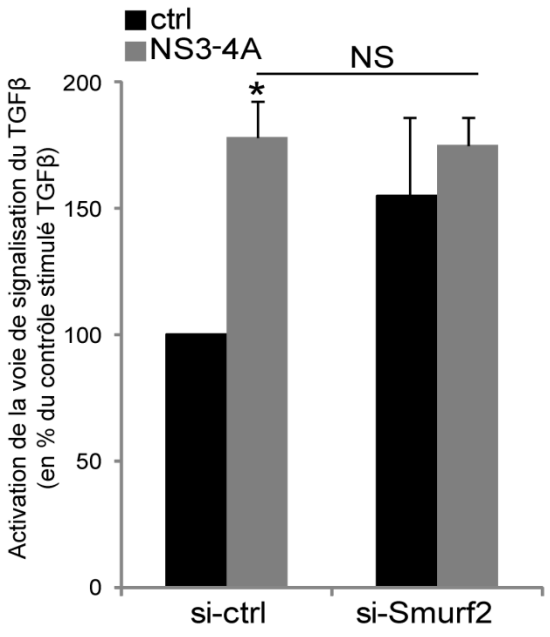


Figure 34 : L'extinction d'expression de Smurf2 mime l'effet amplificateur de NS3-4A. Les cellules ont été mises en plaque et transfectées 24h après avec le si-ARN contre Smurf2 ou le si-ARN contrôle puis avec le système rapporteur SBE-luciférase et le plasmide d'expression pour NS3-4A 4h plus tard. 24h après transfection les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ ou avec le véhicule contrôle pendant 6h avant la lyse et la lecture de luminescence. Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.* p<0,05 comparé aux cellules contrôles (test de Student).

L'ensemble de ces résultats indique que la protéase NS3-4A et la protéine Smurf2 ont des effets antagonistes sur la voie de signalisation du TGFβ. Les effets de NS3-4A sur la signalisation du TGFβ peuvent être reproduits par l'extinction d'expression de Smurf2. NS3-4A pourrait donc augmenter la signalisation du TGFβ en inhibant les fonctions de Smurf2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation.

c. Etude des mécanismes potentiels

Etant donné que Smurf2 peut moduler la signalisation du TGFβ par de nombreux mécanismes, nous avons exploré les effets de NS3-4A sur différentes fonctions de Smurf2.

- Impact de NS3-4A sur la dégradation du TβR

La protéine Smurf2 est une E3-ubiquitine ligase. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié l'importance de l'activité enzymatique de cette protéine dans l'inhibition de l'effet amplificateur de NS3-4A sur l'activation de la voie de signalisation du TGFβ. Nous avons travaillé avec la protéine Smurf2-C716A, qui est dépourvue d'activité ubiquitine ligase. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la surexpression de la protéine Smurf2-C716A inhibe l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ de la même manière que la protéine Smurf2 non mutée (fig. 35A). Une des cibles d'ubiquitination de Smurf2 est le récepteur TβRI dont elle induit la dégradation par le protéasome. Après marquage métabolique au ^{35}S des protéines néosynthétisées nous avons suivi la dégradation du TβRI en présence ou non de la protéine virale NS3-4A (fig. 35B et C). Pour cela nous avons travaillé dans des cellules HEK293 exprimant stablement le TβRI avec une étiquette HA. Ces cellules ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou un plasmide contrôle. 24 heures après la transfection, le marquage métabolique des protéines néo-synthétisées a été réalisé pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été stimulées avec

du TGFβ pendant une ou deux heures. Apres immunoprécipitation du TβRI-HA sur une quantité constante de protéines totales de lysat, la dégradation du TβR-I marqué au ^{35}S a été suivie après séparation par SDS-PAGE, en utilisant un PhosphoImager. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les cellules contrôles et les cellules exprimant la protéine virale (fig. 35B et C).

Nous pouvons donc conclure que Smurf2 contrecarre l'effet amplificateur de NS3-4A de façon indépendante de son activité ubiquitine ligase

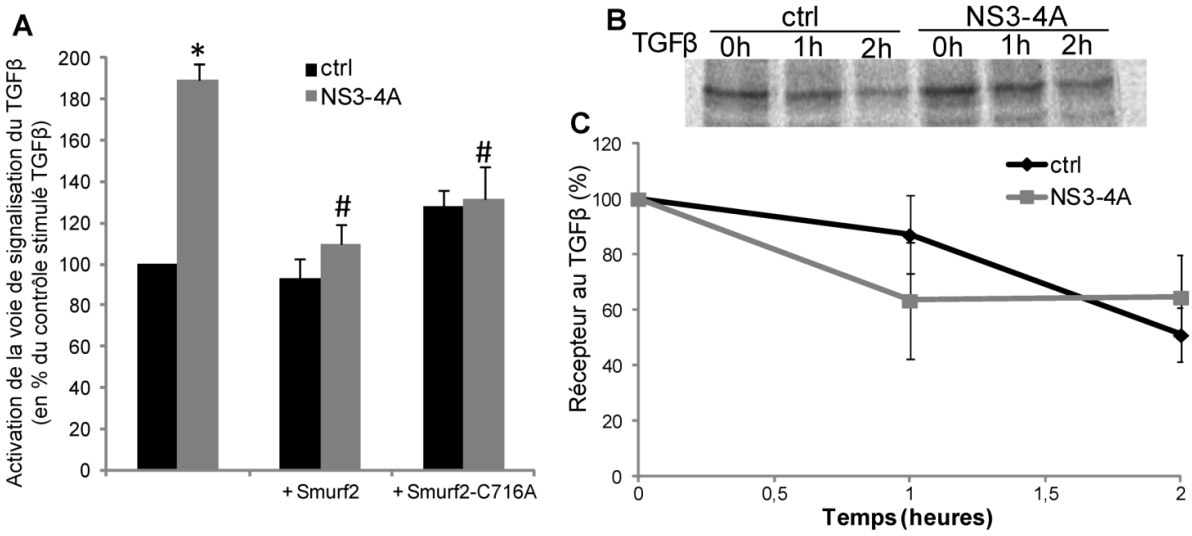


Figure 35 : L'activité ubiquitine ligase de Smurf2 n'est pas impliquée dans la suppression de l'effet amplificateur de NS3-4A. (A) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou un plasmide contrôle, avec les plasmides d'expression de Smurf2 ou Smurf2-C716A, et avec le rapporteur SBE-luciférase. 24h après transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse des cellules et la lecture de luminescence. Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.* p<0,05 comparé aux cellules contrôles, # p<0,05 comparé à NS3-4A +TGFβ (test de Student). (B, C) Analyse de la vitesse de dégradation du TβR. Les cellules HEK293 exprimant de façon stable le TβRI-HA ont été transfectées avec un vecteur d'expression NS3-4A ou de contrôle. Après un marquage métabolique des protéines néosynthétisées au ^{35}S pendant 30min, les cellules ont été stimulées avec 2,5ng/mL de TGFβ pendant les temps indiqués avant la lyse. Le TβRI a été immunoprécipitée avant analyse par SDS-PAGE (B) détection du TβRI marqué au ^{35}S (C) Analyse de la dégradation de TβRI Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes.

- Impact de NS3-4A sur l'endocytose du complexe de TβR

La protéine Smurf2 est aussi connue pour son rôle dans l'endocytose du complexe de récepteurs du TGFβ (Di Guglielmo et al., 2003; Meyer et al., 2011). En effet, Smurf2 est associée aux récepteurs lorsqu'ils sont internalisés par la voie dépendante des cavéoles. Nous avons donc étudié l'impact de l'expression de NS3-4A sur la quantité de TβR associée aux

cavéoles. Afin de répondre à cette question, nous avons dans un premier temps envisagé d'étudier la localisation de TβRI par microscopie confocale. Malheureusement le niveau d'expression de Smurf2 dans les hépatocytes est faible. Il aurait donc fallu surexprimer Smurf2 pour le détecter en immunofluorescence. Or nous avons observé tout au long de ce travail que la surexpression de Smurf2 abroge l'effet de NS3-4A, ce qui rend impossible cette étude en microscopie. Nous avons donc dans un second temps, décidé d'étudier l'association du récepteur aux radeaux lipidiques à la membrane plasmique. En effet, les vésicules d'endocytose couvertes de cavéoline se forment à partir des radeaux lipidiques présents à la membrane plasmide. Cette analyse a été réalisée à partir de plusieurs lignées cellulaires surexprimant ou non le TβR-I et NS3-4A. Afin d'obtenir des fractions contenant suffisamment de matériel, il a été nécessaire de travailler avec des grandes quantités de cellules. Ainsi, après extraction des radeaux lipidiques insolubles au triton X-100 et enrichissement par ultracentrifugation, nous avons pu observer que l'expression de NS3-4A n'induisait pas de changement majeur de quantité de TβR-I dans les radeaux lipidiques (fig. 36A). Cependant, la méthode de purification des radeaux lipidiques n'est pas une méthode quantitative et nous avons observé des variations importantes de rendement de purification, suivi par la quantité de cavéoline 2. Nous n'avons donc pas pu étudier si l'expression de NS3-4A induit des variations dans l'équilibre d'endocytose de TβRI

Une autre façon d'aborder la question est d'étudier combien de temps leTβRI reste actif. En se basant sur les travaux de Gunaratne *et al* (Gunaratne et al., 2012), nous avons étudié la durée de la phosphorylation des protéines R-Smad. Nous avons déjà mis en évidence que dans les cellules exprimant la protéine NS3-4A, la phosphorylation des protéines R-Smad induite par le TGFβ est augmentée et stabilisée (fig. 32). Ici, nous avons étudié combien de temps la voie de signalisation reste active après un pulse de TGFβ pendant 30 minutes. Brièvement,

après stimulation par le TGFβ pendant 30 minutes, les cellules ont été lavées avec du PBS avant ajout de milieu frais. Les cellules ont été lysées 1h (90 minutes) ou 4h (270 minutes) après l'ajout du milieu frais. Ainsi les récepteurs activés pendant les 30 minutes de stimulation par le TGFβ activent les protéines R-Smad par phosphorylation jusqu'à leur désactivation. Plusieurs mécanismes conduisent à la désactivation des récepteurs comme par exemple leur endocytose cavéole-dépendante ou bien leur déphosphorylation. Le lavage des cellules après la stimulation par le TGFβ permet donc d'étudier la durée de signalisation des récepteurs activés. Nous avons ainsi montré que dans les cellules exprimant NS3-4A, la quantité de phospho-R-Smad est plus importante à 270 min (c'est-à-dire 4 heures après le retrait du TGFβ) que dans les cellules contrôles, indiquant une durée de signalisation plus importante (fig. 36B-D) suggérant un impact de la protéine virale sur la désactivation de la voie de signalisation.

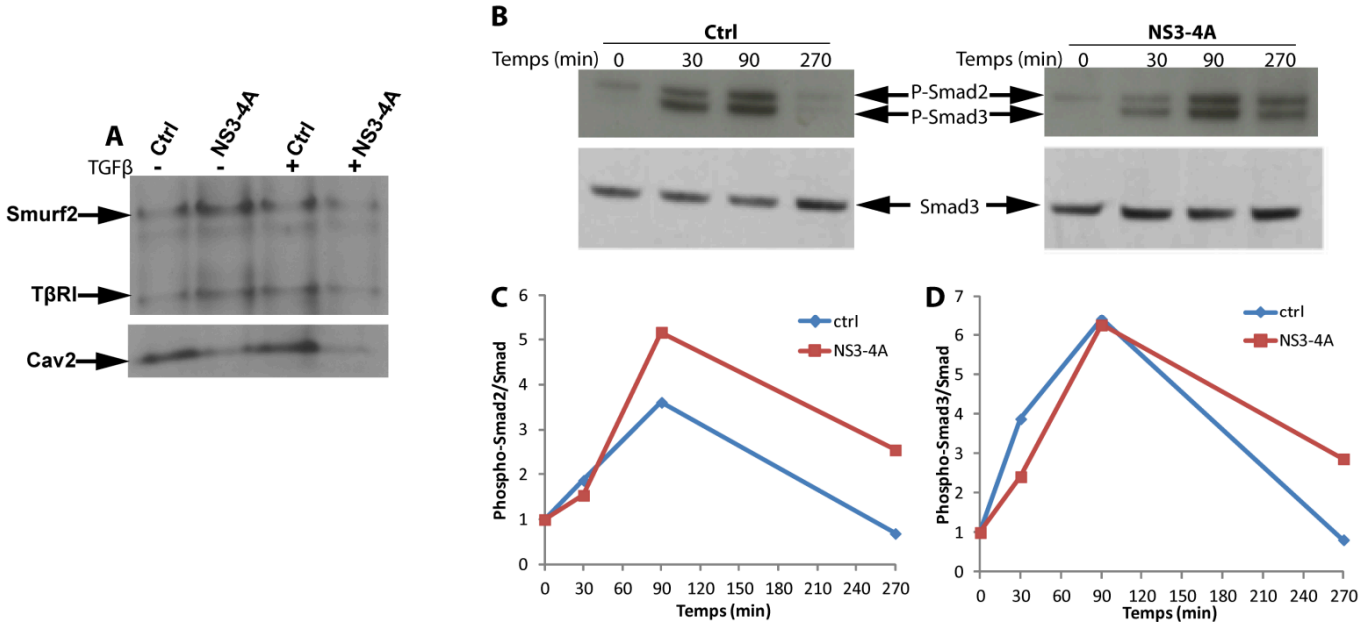


Figure 36 : Impact de l'expression de NS3-4A sur la localisation subcellulaire de TβR et son activité. (A) Les cellules HEK293T exprimant stablement le TβRI-HA, ont été mises en plaque et transfectées avec les plasmides d'expression de Smurf2 et de NS3-4A ou le plasmide contrôle. 24h après la transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 1h avant la lyse et la séparation des rafts lipiques, les fractions contenants les radeaux lipidiques ont été regroupées pour chaque condition avant séparation protéique par SDS-PAGE et révélation avec des anticorps anti-Smurf2, anti-HA et anti-cavéoline 2. (B-D) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle. 24h après les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 30min puis rincées avant l'ajout de milieu et la lyse 1h et 4h après l'ajout de milieu frais. Les protéines Phospho-Smad2/3 et Smad3 ont été détectées par WB (B). Après quantification des signaux (C, D).

- Impact de NS3-4A sur la formation des complexes Smad7/Smurf2

Enfin la protéine Smurf2 joue un rôle important dans la boucle de rétrocontrôle de la voie de signalisation du TGFβ en s'associant à la protéine Smad7. Nous avons donc analysé l'impact de la protéine NS3-4A sur l'interaction Smad7/Smurf2. Deux hypothèses ont été étudiées : la disruption des complexes Smad7/Smurf2 par NS3-4A, la possible formation du complexe ternaire Smad7/Smurf2/NS3-4A et l'impact de NS3-4A sur la localisation subcellulaire de Smad7.

L'analyse de l'interaction entre Smad7 et Smurf2 en présence de NS3-4A, par plusieurs techniques comme la co-immunoprécipitation, a mis en évidence que l'expression de NS3-4A n'empêche pas l'interaction entre Smad7 et Smurf2.

Pour analyser la formation des complexes ternaires Smad7/Smurf2/NS3-4A, nous avons utilisé plusieurs techniques : double co-immunoprécipitations, PCA (protein complementation assay) (Cassonnet et al., 2011). Cependant aucune technique n'a permis de conclure avec certitude sur la formation de ces complexes. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces difficultés, la plus évidente est l'impact délétère de l'expression de la protéase NS3-4A dans les cellules empêchant une forte surexpression.

3. Impact de la dimérisation de NS3-4A sur l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ

Tout au long de ce travail, nous avons mis en évidence que la protéine NS3-4A et le réplicon subgénomique ont des impacts similaires sur la voie de signalisation du TGFβ. De plus, dans ces deux modèles la protéine Smurf2 joue un rôle crucial en ayant un rôle antagoniste à l'effet du réplicon subgénomique et de la protéase NS3-4A. Afin d'étudier l'importance de la protéine NS3-4A dans l'effet du réplicon subgénomique, nous avons eu la

chance de pouvoir travailler avec des molécules mises au point par l'équipe du Dr. Lamarre (Université de Montréal, Canada). Dans un crible haut débit par BRET (transfert d'énergie entre molécules bioluminescentes) ces molécules ont été identifiées comme inhibitrices de la dimérisation de NS3-4A et ont été testées sur la réplication virale dans un système réplicon. Ces molécules sont encore à l'étude afin d'être mieux caractérisées et de pouvoir identifier des candidats pour un futur développement thérapeutique. Par exemple, les constantes d'affinité de ces molécules pour NS3-4A sont actuellement étudiées par résonance plasmonique de surface (Biacore). Les résultats préliminaires semblent indiquer une plus grande affinité de la molécule 2 pour la liaison à NS3-4A.

Nous avons étudié l'impact de ces molécules sur l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la signalisation du TGFβ analysée à l'aide du rapporteur SBE-luciférase. Nous avons travaillé avec une dose de 0,1µM de ces molécules, ajoutées 6h post-transfection du rapporteur dans les cellules Huh9.13 ou cured, et laissée pendant la stimulation par le TGFβ. Cette dose est bien inférieure à la dose inhibant à 50% la réplication virale (0,3 µM pour la molécule 1 et 30 µM pour la molécule 2).

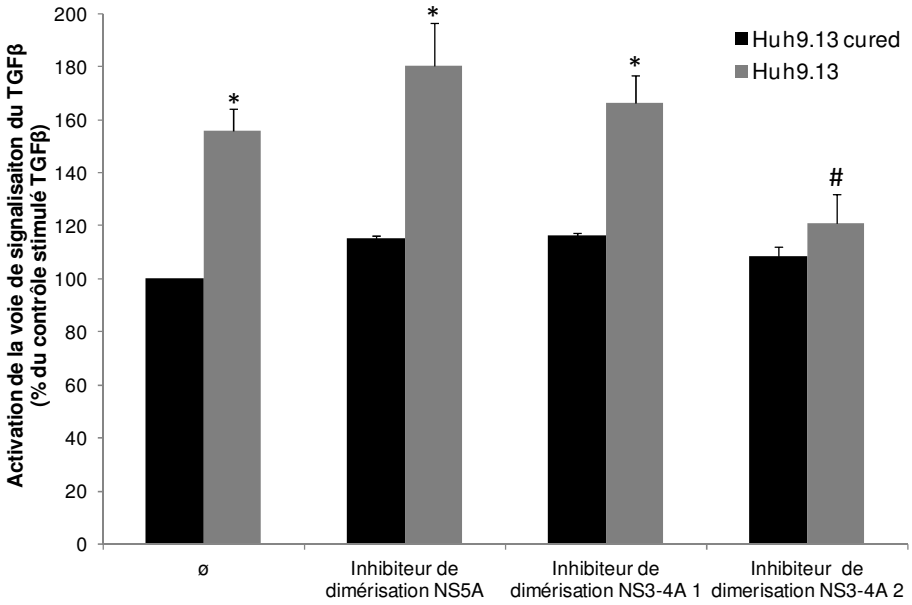


Figure 37 : L'inhibition de la dimérisation de NS3-4A bloque l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ. Les cellules ont été mises en plaque 24h avant la transfection avec le gène SBE-luciférase. Les molécules ont été ajoutées 6h post-transfection dans un milieu frais à la dose de 0,1 µM. 24h après transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant la lyse et la lecture de luminescence. Moyenne ± SE pour 3 expériences indépendantes. * p<0,05 comparée aux cellules contrôles, # p<0,05 comparée aux cellules Huh9.13 + TGFβ

Nous avons ainsi mis en évidence que la molécule 2 inhibe totalement l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ (fig. 37) sans avoir d'impact sur les cellules contrôles. Aucun impact n'a été observé pour la molécule 1 (fig. 37). Il est intéressant de noter qu'un inhibiteur de la dimérisation de NS5A n'influence pas de manière significative l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation du TGFβ. Cependant la tendance indique que l'inhibiteur de la dimérisation de NS5A renforce l'effet amplificateur du réplicon subgénomique. Cette tendance pourrait être liée à la perturbation de l'interaction connue entre NS5A et TβRI (Choi and Hwang, 2006) qui joue un rôle inhibiteur sur la voie.

L'ensemble de ces résultats, suggèrent que l'effet amplificateur du réplicon subgénomique nécessite la dimérisation de la protéine NS3-4A.

IV. Le TGFβ régule l'expression de gènes associés à la carcinogenèse dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique

1. Objectifs

Le TGFβ est une cytokine multifonctionnelle, au rôle ambivalent durant la carcinogenèse. Afin d'étudier de manière plus globale l'impact des protéines virales non structurales sur la réponse des cellules au TGFβ, nous avons réalisé une étude de transcriptome sur les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured stimulées ou non par le TGFβ pendant 6h, dont les ARN ont été extraits au laboratoire. La quantification des ARN messagers de ces cellules a été réalisée par la société lyonnaise Profil'Expert à l'aide de puces pangénomiques Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0. Nous avons ensuite analysé les résultats afin d'identifier les gènes régulés par le TGFβ dans ces deux lignées à l'aide du logiciel Genespring.

2. Les termes GO associés aux gènes régulés par le TGFβ diffèrent entre les 2 lignées

La première étape de l'analyse du transcriptome a été d'obtenir pour chaque lignée la liste des gènes dont la transcription est régulée à la hausse et à la baisse par le TGFβ. Pour cela nous avons travaillé avec la dernière version (12) du logiciel Genespring. La comparaison des quadruplicates issus de quatre expériences indépendantes montre des coefficients de corrélation supérieurs à 0.97 pour chaque condition (test de Pearson), indiquant donc que nos réplicats sont homogènes. A partir du logiciel genespring, nous avons

éliminé les sondes correspondant aux ARN messagers les moins exprimés, pour lesquels les signaux sont noyés dans le bruit de fond. Un regroupement des sondes correspondant à un même gène final a ensuite été réalisé par le logiciel attribuant à chaque gène la moyenne des intensités des sondes. Ensuite, les FC induits par le TGFβ ont été calculés. Nous avons uniquement conservé les gènes dont la variation d'expression induite par le TGFβ est supérieure ou égale à 2 (valeur absolue de FC ≥ 2) et significative (p-value corrigée $< 0,05$, test de Benjamini-Hochberg). Nous avons ainsi mis en évidence respectivement 106 et 128 gènes régulés positivement par le TGFβ dans les lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured (tables 5 et 7 et fig. 38C) et 38 gènes régulés négativement par le TGFβ dans les deux lignées (tables 6 et 8 et fig. 38C). Un grand nombre de gènes sont communs aux 2 lignées, 72 parmi les gènes positivement régulés, 26 parmi ceux régulés négativement (fig. 38A et B). Les gènes spécifiques à chaque lignée sont indiqués en gras dans les tables. Les valeurs de FC induits par le TGFβ pour chacun de ces gènes sont reportées en annexe (annexe 1)

Table 5: liste des gènes régulés positivement par le TGFβ dans les Huh9.13

ABCA5	EPPK1	LOC100506781	RELL1
ACOX3	ETS2	LOC389332	RFK
ADAMTS6	F3	LOC727820	RND1
AGBL2	FAM113B	**LOC728431**	**SDC4**
AMIGO2	FAM47E///STBD1	**LOH3CR2A**	SERPINE1
ANGPTL2	**FHOD3**	LOXL4	SERPINE2
BCAR3	FLRT2	LPAR6	**SIK1**
BCL2L11	FST	MAB21L2	**SIPA1L2**
BHLHE40	FZD2	MAP4K4	SKI
BMF	GADD45B	MICAL2	SKIL
BMPR2	**GPC6**	**NCF2**	SLCO2A1
C10orf26	GPR157	NPNT	**SMAD3**
C11orf17///NUAK2	H2AFY2	NPW	SMAD7
C12orf49	**HES4**	Nr6a1	**SORL1**
C1orf106	HEY1	**NRP2**	SUN3
C8orf4	**IER3**	**NUAK1**	**TGFB1**
CADM1	INHBE	NUPR1	**tgfbr1**
CDKN2B	**Itgav**	OGFRL1	TMC7
CHST15	JUN	OSBPL6	**TMEM49**
CSPP1	JUNB	PDE9A	TNS1
DDIT4	KLF7	PDGFA	TRIB1
Dhrs3	LARP6	PGM2L1	UACA
DKK1	LEFTY1	**PPP1R13L**	ULK1
DNMT3B	LARP6	PGM2L1	**VIM**
ELF4	LEFTY1	**PPP1R13L**	**ZFP36L1**
ENC1	LGR5	PRRG4	ZNF597
Epas1	LIPG	**RAP1GAP2**	ZXDA///ZXDB

Table 6 : liste des gènes régulés positivement par le TGFβ dans les Huh9.13-cured

ABHD6	EPPK1	**LOC283392**	RFK
ACOX3	**ERBB2**	LOC389332	RND1
ADAMTS6	ETS2	LOC727820	**SAMD11**
AGBL2	F3	**LOC728855///FAM91A2///**	SERPINE1
AK3	FAM113B	**FLJ39739///LOC100286793**	SERPINE2
AMIGO2	**FAM177A1**	**///LOC728875**	**SGK1**
BCAR3	FAM47E///STBD1	LOXL4	SKI
BCL2L11	**FGD6**	LPAR6	SKIL
BHLHE40	**FLJ35776**	**LRRN1**	**SLC16A6**
BMF	FLRT2	MAB21L2	**SLC2A12**
BMPR2	**FOXF2**	MAP4K4	SLCO2A1
C10orf26	FST	**MEX3B**	SMAD7
C12orf49	FZD2	MICAL2	**SMARCD3**
C17orf44	GADD45B	**MLLT11**	**ST3GAL5**
C1orf106	**GPR133**	**NANOS1**	SUN3
C1orf161	GPR157	**NCRNA00085**	TMC7
C9orf95	**GRAMD1A**	NPNT	**TMEM87B**
CADM1	H2AFY2	NPW	TNS1
CAPS2	HEY1	**NR2F6**	TRIB1
CCNG2	**HTRA3**	Nr6a1	UACA
CDC42SE1	**IER5L**	**NTAN1**	ULK1
CLIP2	**IL9**	NUPR1	**UPP1**
COL12A1	INHBE	OGFRL1	ZNF597
CPA6///CPB1	JUN	**OR7E14P**	ZXDA///ZXDB
CXXC5	JUNB	OSBPL6	
CYP19A1	**KLF10**	**PALMD**	
DDIT4	KLF7	PDE9A	
Dhrs3	LARP6	PDGFA	
DKK1	LEFTY1	**PFKFB3**	
DLX2	LGR5	PGM2L1	
DNMT3B	LIPG	PPP1R3B	
DOCK8	**LOC100132999**	PRRG4	
DUSP1	LOC100506781	**PTGER4**	
ENC1	**LOC157273**	**RAP1GAP**	
ENO3	**LOC283278**	RELL1	

Table 7 : liste des gènes régulés négativement par le TGFβ dans les Huh9.13

ADAMTS1	DUSP6	MYC	RAPGEF5
AHR	**EREG**	**MYCN**	RASSF9
AREG	**FLRT3**	NCKAP5	RGS2
CCL20	FRMD3	**NFKBIZ**	SLC26A3
CCR6	**GALNT5**	**NR2F2**	**SLC7A2**
CXCL2	HLF	**NXPH2**	SPRY1
CXCL5	ID3	OSTBETA	SPTLC3
CYP39A1	ID4	PAG1	TDO2
DUSP4	**IGFBP1**	PLD6	
DUSP5	LOC730101	**RAB27B**	

Table 8 : liste des gènes régulés négativement par le TGFβ dans les Huh9.13-cured

ADAMTS1	DUSP5	**MAFF**	**RCHY1**
AGTR1	DUSP6	MYC	RGS2
AHR	**ETV1**	NCKAP5	SLC26A3
AREG	FRMD3	**OBFC2A**	**SLCO1B3**
CCL20	**HEPACAM2**	OSTBETA	SPRY1
CCR6	HLF	PAG1	SPTLC3
CTGF	ID3	PLD6	TDO2
CXCL5	ID4	**PPM1K**	**TNFSF4**
CYTIP	LOC730101	RAPGEF5	
DUSP4	**LRP12**	RASSF9	

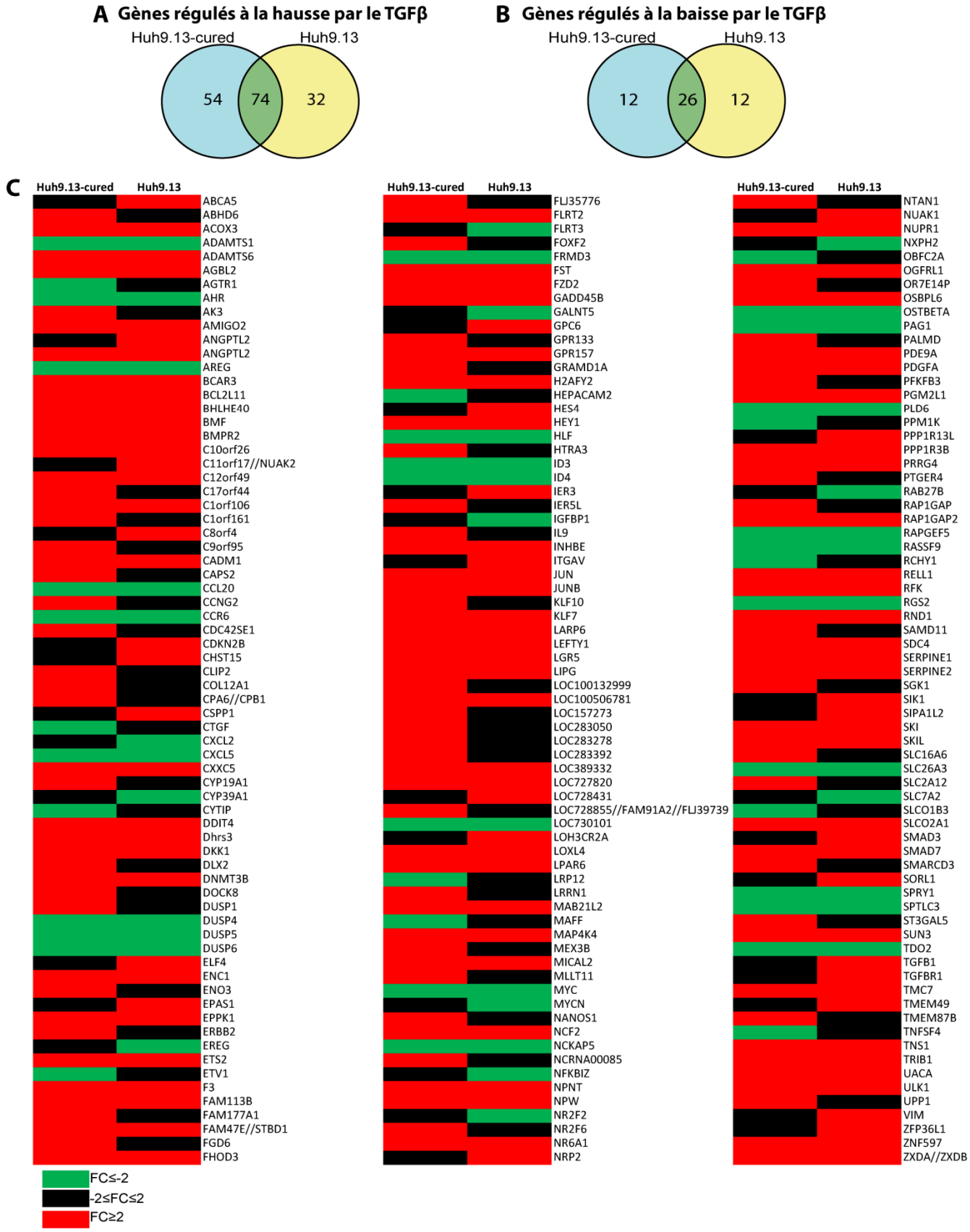


Figure 38 : Gènes régulés par le TGFβ dans les Huh9.13 et les Huh9.13-cured. Après 6h de stimulation par le TGFβ les ARN des cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été extraits et l'analyse des ARN par puces Human Genome U133 plus 2.0 (Affymetrix) a été réalisée par la société Profil'Expert. L'étude a été réalisée à partir de quadruplicate pour chaque condition (16 puces totales). Pour chaque lignée, les FC induits par le TGFβ ont été calculés pour chaque gène présent dans la puce. Nous avons conservé uniquement les gènes dont abs(FC)≥ 2 et dont la régulation induite par le TGFβ est significative. Diagramme de Venn pour les gènes régulés positivement (A) ou négativement (B) par le TGFβ. Heat map pour les 210 gènes régulés par le TGFβ dans une des deux lignées (C).

Une fois ces listes de gènes obtenues, nous avons étudié les termes GO (gene ontology) associés à ces différentes listes (Ashburner et al., 2000). Cette analyse a été réalisée en ligne à partir de la base bio-informatique DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b). Nous nous sommes focalisés sur les termes GO de la catégorie « biological process ». Les listes complètes des termes GO significativement associés à chaque liste de gènes sont présentées en annexe 2.

De manière intéressante, un plus grand nombre de termes GO est associé aux gènes régulés par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique comparé aux cellules contrôles. Afin d'illustrer ces différences, nous avons reconstruit l'arbre GO reliant les 76 termes GO significativement enrichis dans au moins une de nos listes de gènes à l'aide de la base de connaissance AmiGO v1.8 (annexe 3). Nous avons ensuite sélectionné les quinze termes GO situés aux extrémités des branches et nous avons calculé des scores GO d'enrichissement (fig. 39). Les scores GO correspondent à la valeur absolue du logarithme de la p-value calculée par la base de connaissance DAVID (test de Benjamini, cf annexe 2). Pour une liste de gènes donnée, la p-value calculée pour un terme GO est représentative du nombre de gènes présents dans la liste associés à ce terme GO pondéré par le nombre total de gènes de la liste et le nombre total de gènes associés à ce terme GO dans le génome.

Il est intéressant de remarquer qu'aucun terme GO n'est significativement associé aux gènes régulés négativement par le TGFβ (fig. 39C). Cependant ces gènes jouent un rôle dans la réponse totale des cellules au TGFβ puisque les termes GO significativement enrichis ne sont pas identiques selon que l'on analyse l'ensemble des gènes régulés par le TGFβ (fig. 39A) ou les gènes positivement régulés par le TGFβ (fig. 39B).

Un seul terme GO est significativement associé aux gènes régulés par le TGFβ dans les deux lignées (response to external stimulus). Ce terme GO illustre l'activité multifonctionnelle du TGFβ, capable d'activer de nombreuses voies de signalisation.

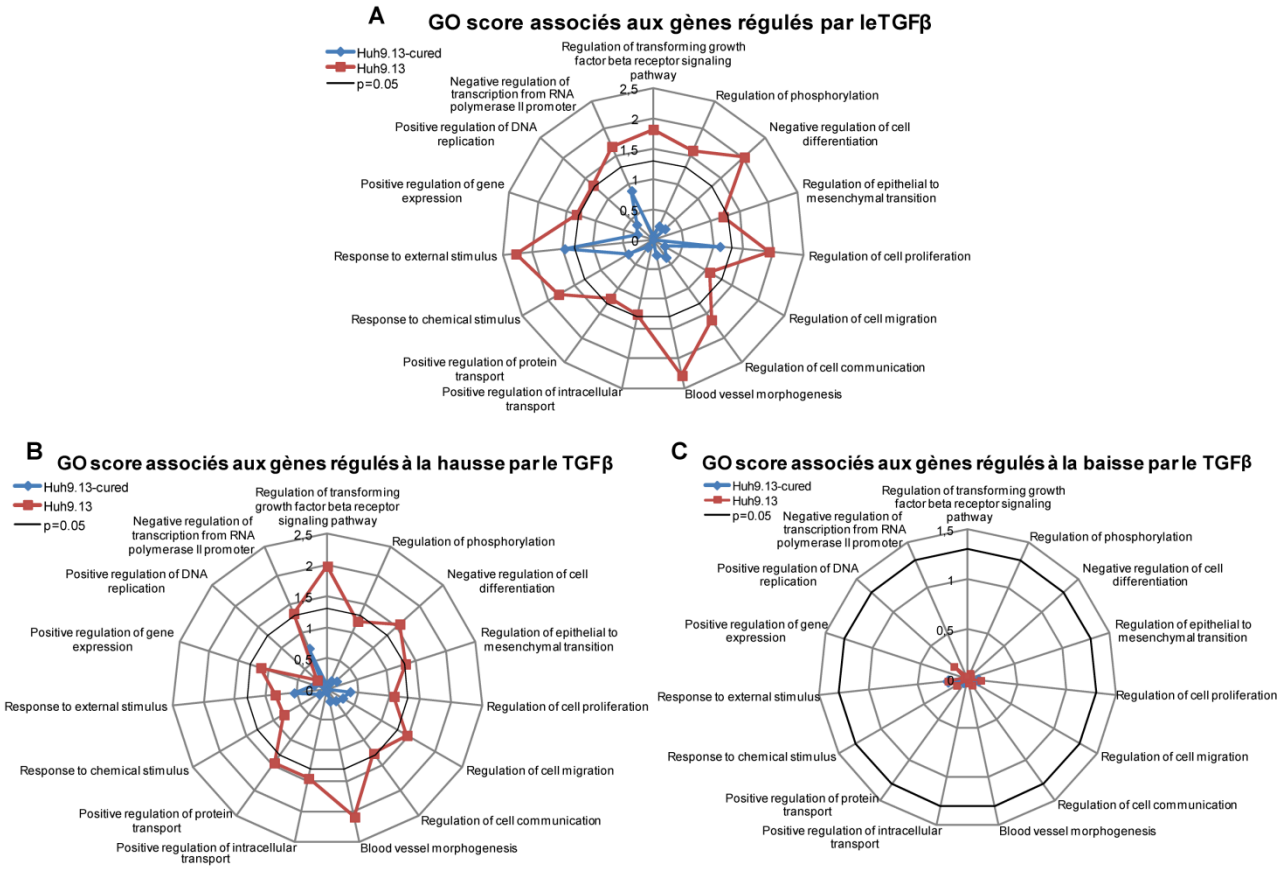


Figure 39 : Termes GO associés aux gènes régulés positivement et négativement par le TGFβ dans les deux lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured. A partir de l'analyse réalisée avec DAVID, des scores GO ont été calculés (-log(p-value)) pour les termes GO associés aux listes de gènes régulés positivement (B), négativement (C) ou positivement et négativement par le TGFβ (A) dans les deux lignées. La p-value utilisée est celle corrigée après un test de Benjamini-Hochberg.

Les scores GO associés aux quinze termes GO choisis dans cette analyse sont toujours plus importants pour les cellules Huh9.13. Ce résultat nous indique un plus fort enrichissement pour ces termes GO dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique.

Il est important de souligner que les lignées Huh9.13 et Huh9.13-cured dérivent de la lignée Huh7, une lignée d'hépatocarcinome humain. Une action pro-tumorale du TGFβ est donc attendue dans ces lignées. Cependant l'analyse des termes GO nous indique la mise en place d'une réponse pro-tumorale induite par le TGFβ uniquement dans les cellules Huh9.13. En effet parmi les termes GO associés à la réponse au TGFβ enrichis uniquement dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, on retrouve « blood vessel morphogenesis », « negative regulation of cell differentiation », « regulation of cell proliferation », « regulation of cell migration », », « regulation of cell communication ». Ce résultat suggère que dans les

cellules exprimant le réplicon subgénomique, le TGFβ favorise des processus liés à la cancérisation.

Il est particulièrement intéressant de remarquer parmi les termes GO significativement associé aux gènes régulés à la hausse par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique la présence du terme « regulation of epithelial to mesenchymal transition ». La présence de ce terme GO est tout à fait en accord avec les résultats obtenus en PCR array et en microscopie indiquant que dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique le TGFβ induit un phénotype d'EMT, ce qui n'est pas le cas dans les cellules Huh9.13-cured après 48h de stimulation par TGFβ.

3. Focus sur des gènes spécifiques de la réponse au TGFβ dans les cellules Huh9.13 ou Huh9.13-cured

Afin d'analyser plus en détails la réponse au TGFβ dans la lignée exprimant le réplicon subgénomique et dans la lignée contrôle, nous nous sommes intéressés à quelques gènes spécifiques à chaque lignée et dont la régulation induite par le TGFβ est significativement différente entre les deux lignées ($p<0,05$, test de Student).

a. Dans les cellules contrôles Huh9.13-cured

- CTGF

La régulation à la baisse de CTGF par le TGFβ dans la lignée contrôle alors que son expression n'est pas régulée dans les lignées exprimant le réplicon subgénomique est particulièrement intéressante. Habituellement, l'expression de CTGF est augmentée par le TGFβ. La protéine CTGF coopère avec le TGFβ dans l'induction de la fibrose du foie chez les patients ayant une infection virale (Tache et al., 2011). Cette protéine est considérée

comme un marqueur de la fibrose du foie (Kovalenko et al., 2009). De plus il a été mis en évidence que l'inhibition d'expression de cette protéine était associée à l'arrêt de la progression tumorale dans le CHC (Mazzocca et al., 2010). La régulation négative de ce gène par le TGFβ dans les lignées Huh9.13-cured n'est pas en faveur d'un effet pro-tumoral du TGFβ dans ces lignées.

- KLF10 (TIEG1)

L'augmentation d'expression de KLF10 (krüppel-like factor 10) induite par le TGFβ dans les cellules Huh9.13-cured pourrait être lié à l'induction d'une réponse anti-tumorale par le TGFβ dans ces cellules puisque la protéine KLF10 est une protéine suppresseur de tumeurs (Song et al., 2012). L'induction de ce gène par le TGFβ induit l'apoptose par un mécanisme dépendant du stress oxydatif dans des cellules de pancréas (Ribeiro et al., 1999). Les mécanismes d'actions de cette protéine sont encore mal connus. Il a récemment été mis en évidence que dans le cancer du sein, cette protéine inhibe l'invasion cellulaire et les métastases en inhibant la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance EGF (Jin et al., 2012). L'importance de ce facteur dans l'infection par le VHC n'est pas décrite à l'heure actuelle. Cependant de manière intéressante, il a été mis en évidence que la protéine virale E7 de HPV16 pouvait s'associer à KLF10 (Chang et al., 2010), inhibant ainsi l'apoptose induite par KLF10 et pouvant favoriser la cancérisation.

- SGK1

La régulation à la hausse de SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) par le TGFβ dans les cellules contrôles est plus surprenante. Cette protéine joue un rôle important dans la réponse des cellules au stress en induisant la phosphorylation de canaux ioniques. En conséquence, l'expression de cette protéine est associée à la croissance cellulaire (Fagerli et

al., 2011). Cependant, si son expression est augmentée dans les tumeurs, une faible expression de cette protéine est aussi associée à une plus forte récurrence tumorale (Szmulewitz et al., 2012). Cette protéine a notamment été identifiée comme inhibitrice de la voie de signalisation dépendant de Notch (Mo et al., 2011), une voie de signalisation importante dans l'induction de l'EMT (Wang et al., 2012). Il sera donc intéressant d'étudier plus en détail l'absence d'induction de SGK1 par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique et les conséquences sur l'EMT.

- DUSP1 (MKP-1)

L'expression de DUSP1 (Dual Specificity Protein Phosphatase 1) est régulée à la hausse par le TGFβ uniquement dans les Huh9.13-cured. La protéine DUSP1 est une phosphatase des MAPK qui déphosphoryle ERK (Sun et al., 1993). L'absence d'induction d'expression de DUSP1 par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique pourrait contribuer à une activation accrue de ERK et est cohérente avec les observations cliniques indiquant la perte d'expression de DUSP1 chez les patients développant un CHC. De plus, cette différence de régulation entre les deux lignées est à mettre en parallèle avec des travaux précédents de l'équipe. Au sein du laboratoire, il a été démontré que des cellules dendritiques ayant été en contact avec des LVP isolées de patients VHC^{+}, exprimant notamment NS5A, présentent un défaut de réponse à TLR4 et le traitement des cellules dendritiques avec un inhibiteur de ERK permet de corriger ce défaut (Agaugué et al., 2007). De plus, les cellules dendritiques obtenues à partir de monocytes isolés de patients chroniquement infectés par le VHC présentent le même défaut de réponse à TLR4 et le traitement avec l'inhibiteur de ERK a le même impact (Perrin-Cocon et al., 2008). D'autres études confirment l'importance des perturbations de la voie ERK durant l'infection par le VHC et le maintien de l'activation de cette voie de signalisation (Li et al., 2010a; Paulino et al., 2011; Schmitz et al., 2008). Il serait

donc intéressant d'étudier l'importance de DUSP1 dans le maintien d'un niveau élevé de phospho-ERK dans les cellules infectées.

b. Dans les cellules Huh9.13

- IGFBP1

Parmi les gènes régulés à la baisse par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, le gène IGFBP1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) est particulièrement intéressant. Dans des conditions physiologiques normales, la protéine IGFBP1 contrôle la biodisponibilité d'IGF (Clemmons, 1997). Il a été mis en évidence que de faibles concentrations d'IGFBP1 circulantes étaient associées à l'insulino-résistance et au diabète (Lewitt et al., 2008; Sandhu et al., 2002). La régulation négative d'IGFBP1 par le TGFβ a déjà été mise en évidence dans des cellules stromales endométriales (Kane et al., 2010). Dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, la régulation à la baisse de IGFBP1 par le TGFβ est particulièrement intéressante car l'infection chronique par le VHC peut induire une insulino-résistance et un diabète de type2 (Parvaiz et al., 2011). A l'heure actuelle, l'impact des protéines non structurales du VHC sur l'expression d'IGFBP1 n'est pas connu, cependant il a été mis en évidence que la protéine Core pouvait induire la dégradation de IRS (insulin receptor substrate) diminuant ainsi le niveau d'expression de IGFBP1 (Alberstein et al., 2012). L'étude détaillée de l'impact des protéines non structurales sur la régulation d'IGFBP1 par le TGFβ pourrait donc permettre de mieux comprendre l'insulino-résistance associée à l'infection chronique par le VHC.

- EREG

La diminution d'expression de l'épiréguline (EREG) induite par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 est surprenante. En effet l'expression de la protéine EREG, qui appartient à

la famille d'EGF, est impliquée dans la signalisation du récepteur à EGF et induit la croissance des hépatocytes (Komurasaki et al., 2002). Une forte expression d'EREG est généralement associée au développement tumoral (Eltarhouny et al., 2008), cependant son expression est parfois régulée à la baisse dans certains cancers (Yun et al., 2012). Cette protéine a aussi un rôle potentiel dans l'induction de la réponse immunitaire (Shirasawa et al., 2004). Actuellement aucun lien n'a été mis en évidence entre cette protéine et l'infection par le VHC, la mise en évidence d'une régulation à la baisse de son expression par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique est donc une piste à explorer notamment pour l'impact sur la réponse immune.

- NRP2

La régulation à la hausse de la neuropiline 2 (NRP2) par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique est d'un grand interêt puisqu'il s'agit d'une protéine proto-oncogène impliquée dans l'initiation tumorale, la croissance cellulaire et le développement de métastases (Prud'homme and Glinka, 2012). Le blocage de NRP2, avec un anticorps bloquant, inhibe le développement métastatique (Caunt et al., 2008). Cette protéine coopère avec le TGFβ dans l'induction de l'EMT (Grandclement et al., 2011). Les relations entre NRP2 et la voie de signalisation du TGFβ sont nombreuses. En effet NRP2 peut servir de récepteur à la cytokine TGFβ, de plus il semblerait que NRP2 puisse activer le TGFβ à la membrane (Prud'homme and Glinka, 2012).

La régulation à la hausse de NRP2 par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 peut contribuer à une réponse pro-tumorale dans ces cellules.

- NUAK2 (SNARK)

La régulation positive de l'expression de NUAK2 par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 pourrait aussi contribuer à ces processus pro-tumoraux. En effet, la protéine NUAK2 (ou SNARK) est une protéine oncogène jouant un rôle dans la croissance tumorale et la migration du mélanome (Namiki et al., 2011a, 2011b). Cette protéine joue un rôle important dans la réponse des cellules au stress (Lefebvre and Rosen, 2005), notamment en induisant la conversion des fibres d'actine en fibres de stress ce qui favorise le détachement des cellules (Vallenius et al., 2011). La protéine NUAK2 pourrait donc jouer un rôle dans la plus forte polymérisation des fibres d'actine induite par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 (fig. 21). De manière intéressante, il semblerait que cette protéine joue un rôle dans la réplication du VHC, puisque l'extinction d'expression de NUAK2 inhibe la réplication virale de 60% (Ng et al., 2007).

- PPP1R13L (IASPP)

L'expression accrue de PPP1R13L (ou IASPP) induite par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 est particulièrement intéressante. En effet, cette protéine, anti-apoptotique, est un inhibiteur de p53 (Bell and Ryan, 2008). PPP1R13L protège les cellules de la sénescence (Notari et al., 2011) et augmente la tumorigenèse et l'invasion par des mécanismes dépendants et indépendants de p53 (Laska et al., 2009). Dans le cadre du CHC, la régulation à la baisse de PPP1R13L inhibe la prolifération cellulaire et le développement tumoral (Lin et al., 2011). Et dans le CHC associé à l'infection chronique par le VHB, il a été mis en évidence que la protéine X pouvait induire l'expression de PPP1R13L par un mécanisme dépendant de NFκB (Lu et al., 2010).

4. Conclusion

L'analyse de ce transcriptome nous a permis de mettre en évidence que la stimulation par le TGFβ des cellules exprimant le réplicon subgénomique induit la régulation de nombreux gènes caractéristiques d'une réponse pro-tumorale au TGFβ. Il est important de souligner la présence de SKIL et de Smad7 parmi les gènes induits par le TGFβ dans les deux lignées. Ces deux gènes font partie des rares gènes à être induits par le TGFβ dans tous les types cellulaires (Massagué, 2012). L'augmentation d'expression de Smad7 induite par le TGFβ dans ces lignées avait déjà été identifiée dans ce travail par PCR quantitative (fig. 18). Ces résultats de transcriptome renforcent et complètent les analyses réalisées en PCR quantitative.

En plus de Smad7, cinq gènes sont communs à l'analyse du transcriptome et à l'analyse en PCR quantitative par PCR-array (I.1.b, table 2) : ITGAV, RGS2, PAI-1 (serpine1), TGFβ1 et VIM. Ce faible chevauchement s'explique principalement par des raisons techniques. L'analyse du transcriptome a été faite à l'aide de puces pangénomiques. Cette technique permet d'avoir un aperçu du transcriptome mais le seuil de détection est assez élevé. Les ARN messagers faiblement exprimés ne sont donc pas détectés. Or dans les analyses réalisées en PCR quantitative, nous avons observé que de nombreux gènes régulés à la hausse par le TGFβ sont très faiblement exprimés dans les conditions contrôles. De plus, les amorces utilisées sur ces puces ciblent la région 3' des gènes ce qui n'est pas le cas pour les amorces de la PCR quantitative. Ces deux techniques peuvent donc détecter des variants différents. L'analyse du transcriptome par des puces pangénomiques permet donc d'avoir un aperçu des régulations induites par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique mais doivent être complétées par des études plus précises en PCR quantitative comme nous l'avons fait dans le paragraphe I.1.b. Les nouvelles techniques d'étude de transcriptome telle que le « deep sequencing » (Malone and Oliver, 2011) permettant d'étudier les ARN messagers faiblement exprimés et l'ensemble des variants d'un même gène devraient permettre à

l'avenir d'obtenir des descriptions plus complètes des variations transcriptionnelles induites par divers signaux tels que la stimulation TGFβ.

L'analyse des termes GO associés à la réponse au TGFβ dans la lignée exprimant le réplicon subgénomique a mis en évidence des termes GO caractéristiques de la cancérisation tels que « vasculature development », « regulation of cell proliferation », ou encore « regulation of cell motion ». L'induction d'une réponse pro-tumorale par le TGFβ dans la lignée exprimant le réplicon subgénomique est confirmée par la présence parmi les gènes régulés uniquement dans ces cellules de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques, des protéines oncogènes ou encore des protéines coopérant avec le TGFβ dans l'induction de l'EMT.

L'étude de ces gènes et de leur régulation par le TGFβ fournira donc de nouvelles pistes pour comprendre comment les protéines virales non-structurales du VHC favorisent la tumorigenèse.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Dans ce travail nous avons démontré que le réplicon subgénomique et la protéine virale NS3-4A amplifient la signalisation du TGFβ dans des cellules d'hépatome, favorisant ainsi l'induction par le TGFβ d'un état pro-tumoral avec des changements phénotypiques caractéristiques de l'EMT. Nous avons montré que la protéine virale NS3-4A interagit avec la protéine Smurf2, une E3-ubiquitine ligase qui joue un rôle important dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ. La surexpression de Smurf2 inhibe, de manière dose-dépendante, l'effet amplificateur de NS3-4A et du réplicon subgénomique sur la signalisation du TGFβ. De plus, l'inhibition d'expression de Smurf2 mime l'effet amplificateur de NS3-4A et du réplicon subgénomique sur la voie de signalisation. Nos résultats suggèrent donc fortement que NS3-4A inhibe le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation par une titration fonctionnelle de Smurf2.

1. Mécanismes d'interférence de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ

Nous avons montré que l'impact de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ est indépendant de son activité protéasique. En effet, la protéine mutée NS3-4A-S139A, dépourvue d'activité catalytique, a le même impact sur la voie de signalisation que la protéine NS3-4A sauvage. Ce résultat a été confirmé à l'aide de l'inhibiteur de l'activité protéasique de NS3-4A, BILN2061 (Llinàs-Brunet et al., 2004), qui n'a pas d'impact sur l'effet amplificateur de la protéase sur la voie de signalisation du TGFβ. L'expression de la protéine NS3 seule n'a pas d'effet significatif sur la voie de signalisation du TGFβ. Ces résultats indiquent que même si l'effet de NS3-4A est indépendant de l'activité protéasique, l'association entre NS3 et

NS4A est importante pour l'effet amplificateur de NS3-4A. En co-immunoprécipitation, NS3 et NS3-4A établissent les mêmes interactions avec les acteurs de la voie de signalisation du TGFβ. Cependant, des différences d'affinité ou de recrutement d'autres partenaires pourraient expliquer la différence d'effet fonctionnel. Par la technique du double hybride, nous avons mis en évidence que l'interaction entre NS3 et Smurf2 implique le domaine protéase de NS3. L'association entre NS4A et NS3 induit un changement de conformation qui éloigne le domaine protéase du domaine hélicase de NS3 (Brass et al., 2008). Il est possible que cet éloignement favorise l'interaction entre la protéine Smurf2 et la protéine NS3-4A, expliquant la différence d'effet fonctionnel entre les protéines NS3 et NS3-4A. Les changements de conformation induits par l'association de NS4A à NS3 pourraient donc jouer un rôle important dans l'effet amplificateur de NS3-4A.

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la protéase NS3-4A a permis à l'équipe du Dr Daniel Lamarre de mettre en évidence l'importance de la dimérisation de NS3-4A pour la réplication du VHC (données non publiées). Un de ces inhibiteurs de dimérisation inhibe l'effet amplificateur du réplicon subgénomique sur la signalisation du TGFβ, suggérant un rôle de la dimérisation de NS3-4A dans l'effet du réplicon subgénomique. Ce résultat confirme l'importance de la conformation tri-dimensionnelle de la protéine NS3-4A dans son effet amplificateur sur la voie de signalisation du TGFβ.

Parmi les interactions identifiées dans ce travail nous avons mis en évidence que NS3-4A interagit avec la protéine Smurf2 mais aussi avec la protéine Smad3. Il reste difficile de conclure que l'interaction avec Smad3 ne participe pas à l'effet amplificateur de NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ. Cependant, la cinétique de phosphorylation des protéines R-Smad, met en évidence un effet assez tardif de NS3-4A après une heure de stimulation par le TGFβ. Cela suggère davantage un impact sur le rétrocontrôle négatif de la voie de

signalisation qu'un impact direct sur Smad3. Cheng *et al* avaient déjà mis en évidence l'interaction entre NS3 et Smad3 (Cheng et al., 2004). Dans leur travail ils démontrent que la protéine NS3 est une onco-protéine car elle inhibe l'effet anti-prolifératif du TGFβ.

Tout au long de ce travail, nous avons mis en évidence que le niveau d'expression de la protéine Smurf2 influence fortement l'effet du réplicon subgénomique et de la protéine NS3-4A sur la voie de signalisation du TGFβ. Cependant, nous n'avons pas pu démontrer de manière formelle que la modulation de la voie de signalisation du TGFβ observée en présence de la protéine virale NS3-4A est entièrement dépendante de l'interaction entre NS3-4A et Smurf2. Afin de répondre à cette question, il faudrait pouvoir rompre l'interaction entre NS3-4A et Smurf2 sans influencer les autres interactions de NS3-4A avec les acteurs de la voie de signalisation du TGFβ. Pour rompre l'interaction entre NS3-4A et Smurf2, il faudrait disposer de petites molécules ou de peptides ciblant le domaine de NS3-4A impliqué dans l'interaction avec Smurf2. Une autre possibilité serait d'identifier un mutant de la protéine NS3-4A n'interagissant plus avec la protéine Smurf2 mais conservant ses autres interactions. La technique du double hybride inversé pourrait être utilisée pour identifier ce mutant (Vidal and Legrain, 1999; Vidal et al., 1996). Ce système basé sur le concept de « sélection négative » repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur URA3 dont l'expression est toxique pour la levure dans des conditions de croissance spécifique. Ce gène code l'enzyme Ura3 qui catalyse la transformation de l'acide 5-fluoroorotique en un composé toxique pour la levure, l'acide 5-fluoroacyle. Dans ce système, l'interaction de la protéine Smurf2 avec la protéine NS3-4A entraîne l'expression de l'enzyme Ura3 et ainsi la mort cellulaire. Après génération de mutants de NS3-4A, la présence d'une mutation perturbant plus ou moins fortement cette interaction est identifiée car elle provoque une diminution de l'expression du gène rapporteur et donc une survie cellulaire accrue.

L'expression, la sécrétion et l'activation du TGFβ peuvent être régulées lors de l'infection par le VHC. Dans des hépatocytes infectés par le VHC, l'expression du TGFβ est augmentée trois jours post-infection (Presser et al., 2011). Il a aussi été démontré que l'infection par le VHC peut induire l'expression de protéines telles que la furine ou la thrombospondine-1 (Presser et al., 2011). Ces protéines jouent un rôle crucial dans la libération du TGFβ actif. Dans nos conditions de travail, la transcription de TGFβ1 est induite mais n'est pas régulée de manière différentielle dans les cellules exprimant ou non le réplicon subgénomique et il n'a pas été détecté de TGFβ actif dans les surnageants de culture. Ces résultats indiquent que dans nos conditions expérimentales, la sécrétion et l'activation du TGFβ ne contribuent pas à l'effet amplificateur du réplicon subgénomique et de NS3-4A sur la signalisation du TGFβ.

2. Impact de NS3-4A sur les fonctions de Smurf2

L'activité ubiquitine ligase de Smurf2 est impliquée, dans le ciblage de TβRI et de Smad2 au protéasome et dans la mono-ubiquitination de Smad3. Nous avons montré que la surexpression de Smurf2-C716A, dépourvue d'activité ubiquitine ligase, supprime l'effet de NS3-4A sur la voie de signalisation de manière similaire à la surexpression de Smurf2 non mutée. Cela démontre que l'activité ubiquitine ligase de Smurf2 n'est pas impliquée dans la suppression de l'effet amplificateur de NS3-4A par Smurf2. Nous avons aussi montré que l'expression de NS3-4A ne modifie pas la vitesse de dégradation du récepteur TβRI. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la fonction ubiquitine ligase de Smurf2 n'est pas altérée par NS3-4A.

Indépendamment de son activité ubiquitine ligase, la protéine Smurf2 a de nombreux impacts sur la voie de signalisation du TGFβ. Elle module notamment la localisation

subcellulaire du complexe de récepteur. Nos études d'association du complexe de récepteurs aux radeaux lipidiques n'ont pas permis de détecter un impact de NS3-4A sur sa localisation membranaire. Cependant l'étude de la durée de phosphorylation des protéines R-Smad a permis de montrer que les protéines R-Smad restent phosphorylées beaucoup plus longtemps après le retrait du TGFβ dans les cellules exprimant NS3-4A, par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat est cohérent avec une perturbation du rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation. Ainsi, le ciblage de Smurf2 par NS3-4A, pourrait altérer la fonction de Smurf2 dans l'endocytose du complexe de récepteur, limitant la désactivation du récepteur.

De plus, ce ciblage pourrait modifier la localisation subcellulaire de Smad7. En effet, la sortie du noyau de Smad7 est étroitement liée à la stimulation des cellules par le TGFβ et à son association à Smurf2 (Kavsak et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Wiesner et al., 2007). Nos résultats préliminaires indiquent que, au contraire, dans les cellules exprimant la protéase NS3-4A, la stimulation par le TGFβ induit une accumulation de Smad7 dans le noyau (données non montrées). Ce résultat suggère que l'interaction de NS3-4A avec Smurf2 empêche la protéine Smurf2 d'induire la sortie du noyau de Smad7, soit parce que Smurf2 ne peut plus s'associer à Smad7 dans le noyau, soit parce que Smurf2 ne va plus efficacement dans le noyau. Cette rétention de Smad7 dans le noyau pourrait notamment bloquer l'inhibition de phosphorylation des R-Smad.

La protéine Smurf2 exerce aussi des fonctions indépendantes de la voie de signalisation du TGFβ. En effet, cette protéine peut induire la sénescence des cellules, jouant ainsi un rôle anti-tumoral (Zhang and Cohen, 2004). Les études réalisées chez les souris transgéniques Smurf2-/- ont permis de confirmer un rôle suppresseur de tumeurs de Smurf2. En effet, ces souris mutées développent spontanément des tumeurs (Blank et al., 2012; Ramkumar et al.,

2012). Un des mécanismes proposés pour expliquer ce rôle de Smurf2 dépend de la protéine RNF20 dont l'expression stabilisée en absence de Smurf2, provoquerait une altération de la structure de la chromatine et l'induction d'une instabilité génétique favorable au développement de cancers (Blank et al., 2012). Il est intéressant de remarquer que la tumeur la plus fréquemment développée chez les souris Smurf2-/- est un CHC. En conséquence, par son interaction avec Smurf2, NS3-4A pourrait jouer un rôle dans la transformation tumorale des cellules hépatocytaires infectées.

3. Le TGFβ induit un état pro-tumoral des cellules exprimant les protéines du VHC

Le TGFβ est un facteur essentiel dans le développement du CHC lié à l'infection chronique par le VHC. Le taux de TGFβ est plus élevé chez les patients infectés par le VHC développant un CHC que chez les patients atteints d'autres maladies hépatiques (Divella et al., 2012). Chez les patients chroniquement infectés par le VHC, la phosphorylation de la protéine Smad3 dans sa région charnière est associée à une augmentation de l'expression de PAI-1 et au développement de CHC (Matsuzaki et al., 2007). Nous avons mis en évidence que l'expression de PAI-1 est plus fortement induite par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique ou NS3-4A seule.

En outre, les résultats du transcriptome montrent que, dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, le TGFβ induit un état pro-tumoral. En effet, l'analyse des termes GO associés aux gènes induits par le TGFβ dans ces cellules montre un enrichissement des gènes liés à la cancérisation avec des termes GO tels que « vasculature development », « regulation of cell differentiation », « regulation of cell proliferation ». De plus, une analyse plus détaillée des gènes associés à ces termes GO et régulés par le TGFβ uniquement dans les cellules

exprimant le réplicon subgénomique, a révélé la présence de nombreux gènes pro-tumoraux tels que PPP1R13L, NRP2 ou encore NUAK2. PPP1R13L est un inhibiteur de p53 dont l'expression est associée à la prolifération cellulaire et au développement tumoral dans le CHC (Lin et al., 2011). La protéine NRP2 peut coopérer avec le TGFβ durant le cancer colorectal favorisant ainsi l'induction d'EMT (Grandclement et al., 2011). Quant à la protéine NUAK2, elle joue un rôle dans la formation des fibres de stress d'actine. L'augmentation de cette protéine par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique est particulièrement intéressante car dans ces cellules, comme dans les cellules exprimant uniquement la protéine NS3-4A, le TGFβ induit une polymérisation plus importante des fibres d'actine, une caractéristique phénotypique de l'induction d'EMT. Cette interférence des protéines du VHC avec la réponse au TGFβ confirme l'importance de nos travaux dans la compréhension des mécanismes d'induction du CHC chez les patients chroniquement infectés par le VHC.

Dans les étapes tardives de la cancérisation, l'augmentation de la signalisation du TGFβ est associée à l'induction d'EMT qui joue un rôle majeur dans le potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses (Van Zijl et al., 2009). Dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, l'induction d'un phénotype d'EMT par le TGFβ a été associée à la régulation de nombreux gènes impliqués dans le processus d'EMT. Dans ces cellules, le TGFβ induit notamment l'expression de Snai2, un facteur de transcription crucial de l'EMT, alors qu'il inhibe l'expression de ce gène dans les cellules contrôles. Dans le CHC, l'inhibition de Snai2 est corrélée à un processus de MET, l'inverse de l'EMT (Lin et al., 2012). La régulation différentielle de Snai2 pourrait donc expliquer les différences phénotypiques induites par le TGFβ entre les deux lignées cellulaires exprimant ou non le réplicon subgénomique. Dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique, le TGFβ

induit aussi l'expression de nombreux gènes tels que WNT11, WNT5B, NODAL qui peuvent agir en synergie avec le TGFβ. La protéine WNT11 est impliquée dans l'induction de l'expression des gènes mésenchymateux en coopération avec le TGFβ (Zhang et al., 2012b). Alors que l'expression de WNT11 est augmentée dans de nombreux cancers (Dwyer et al., 2010; Nishioka et al., 2011; Uysal-Onganer et al., 2010), une étude a mis en évidence une régulation négative de cette protéine dans le cadre du CHC (Toyama et al., 2010). Cependant, aucune des biopsies de cette étude ne provenait de CHC lié à l'infection chronique par le VHC (Kim et al., 2008; Toyama et al., 2010). L'expression de WNT5B est aussi augmentée durant la cancérisation, notamment dans le CHC (Saitoh and Katoh, 2002; Yuzugullu et al., 2009). Le rôle de la protéine WNT5B dans la carcinogenèse n'est pas encore bien connu. Cependant Malizia et al ont démontré que l'extinction d'expression de WNT5B dans des cellules infectées par EBV diminue l'induction d'EMT par le TGFβ (Malizia et al., 2009). De manière intéressante l'expression de WNT5B est associée au diabète de type 2 (Kanazawa et al., 2004). L'augmentation d'expression de ce gène provoquée par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique apporte de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes d'induction du CHC et du diabète de type 2 chez les patients chroniquement infectés par le VHC. La protéine NODAL, dont l'expression est cruciale dans le développement, active les protéines R-Smad, par l'intermédiaire du récepteur ALK4. L'augmentation d'expression de NODAL provoquée par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique pourrait donc participer à l'augmentation de phosphorylation des R-Smad mise en évidence dans les cellules exprimant NS3-4A. De plus en plus d'évidences démontrent que l'expression de NODAL est augmentée et associée à l'invasion tumorale dans certains cancers tels que le mélanome ou le cancer du pancréas (Lonardo et al., 2011; Strizzi et al., 2012; Topczewska et al., 2006).

La forte régulation à la hausse de ces gènes par le TGFβ peut donc favoriser l'induction d'EMT dans les hépatocytes infectés et pourrait jouer un rôle dans le développement du CHC.

Il a récemment été montré que l'infection par le VHC peut induire l'EMT dans les hépatocytes (Akkari et al., 2012; Wilson et al., 2012) et plusieurs protéines virales semblent jouer un rôle dans cette induction. Dans des hépatocytes primaires, l'expression de la protéine Core est associée à l'induction d'EMT en réponse au TGFβ (Battaglia et al., 2009). Dans ce travail, Battaglia *et al*, montrent que l'expression de la protéine Core seule induit l'expression de marqueurs mésenchymateux dans les hépatocytes et la stimulation par le TGFβ renforce cette induction. Le traitement préalable des hépatocytes avec l'inhibiteur du TβRI inhibe l'impact de la protéine Core et du TGFβ indiquant que l'effet de la protéine seule est probablement due à une augmentation du TGFβ endogène (Battaglia et al., 2009). L'impact de la protéine Core sur la voie de signalisation du TGFβ est probablement lié à l'interaction entre les protéines Core et Smad3 (Pavio et al., 2005). Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 peuvent aussi induire l'EMT dans les hépatocytes par un mécanisme dépendant du TGFβ et de HIF1α (Wilson et al., 2012). Wilson *et al* ont mis en évidence que l'expression des protéines E1 et E2 ou du virus entier induisait l'expression de HIF1α et des facteurs de transcription caractéristiques de l'EMT, Snail et Twist. Ces augmentations d'expression sont associées à une augmentation de la capacité migratoire des cellules. L'utilisation d'un anticorps bloquant le TGFβ inhibe l'impact des protéines E1 et E2 sur la migration des cellules et sur l'expression de Snail et de Twist indiquant un mécanisme dépendant du TGFβ sécrété (Wilson et al., 2012). Une étude récente a mis en évidence l'induction d'EMT par la protéine NS5A, selon un mécanisme indépendant du TGFβ. Dans ce modèle, le TGFβ renforce l'induction d'EMT provoquée par la protéine NS5A (Akkari et al., 2012). Il a aussi été montré que la protéine NS5A inhibe l'apoptose induite par le TGFβ par son interaction avec le TβRI (Choi and Hwang, 2006). D'autres protéines virales comme la protéine Core ou

la protéine NS3 ont été identifiées comme des inhibiteurs de l'apoptose induite par le TGFβ par l'intermédiaire de leur interaction avec Smad3 (Cheng et al., 2004; Pavio et al., 2005). En accord avec ce résultat, parmi les gènes régulés par le TGFβ dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique nous avons identifié plusieurs gènes anti-apoptotiques tels que PPP1R13L, NUAK2 ou encore TNFAIP8 (Kumar et al., 2000; Legembre et al., 2004; Notari et al., 2011).

Dans notre modèle cellulaire, la stimulation par le TGFβ induit peu d'apoptose. Etant donné que nous travaillons avec un modèle de cellules d'hépatome, celui-ci est donc plus adapté pour étudier les impacts du TGFβ dans les stades tardifs de cancérisation c'est-à-dire les effets pro-tumoraux du TGFβ.

4. Synthèse

Comme nous avons pu le voir tout au long de ce travail, la voie de signalisation du TGFβ est particulièrement ciblée par le VHC. Plusieurs protéines virales (Core, NS3, NS5A) interagissent avec des acteurs de la voie de signalisation, influençant ainsi la réponse des cellules au TGFβ.



Figure 40 : Le ciblage de Smurf2 par le VHC est associé à l'induction d'un état pro-tumoral par le TGFβ. Le réplicon subgénomique et la protéine virale NS3-4A induisent une plus forte réponse des cellules au TGFβ et un phénotype d'EMT. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la voie de signalisation du TGFβ résulte du ciblage direct de la protéine Smurf2 par NS3-4A. De plus, le TGFβ induit l'expression de nombreux gènes pro-tumoraux dans les cellules exprimant le réplicon subgénomique.

Cette étude permet de mieux comprendre l'impact des protéines non structurales du VHC et notamment de la protéine NS3-4A dans la modulation de la voie de signalisation du TGFβ, identifiant ainsi de nouvelles pistes pour la compréhension des mécanismes d'induction du

CHC chez les patients chroniquement infectés. Dans ce travail nous avons mis en évidence que le ciblage direct de la protéine Smurf2 par la protéase virale NS3-4A inhibe la fonction de Smurf2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGFβ résultant en une plus forte réponse des cellules au TGFβ. Dans les cellules exprimant NS3-4A ou l'ensemble des protéines non structurales, le TGFβ induit un phénotype d'EMT et l'expression de nombreux gènes pro-tumoraux, favorisant ainsi le processus de transformation des hépatocytes (fig. 40).

Pour finir, l'analyse de l'interactome de Smurf2 a mis en évidence l'important ciblage de ce sous-réseau par des virus. En effet, 12 des 66 voisins de Smurf2 sont ciblés par au moins une protéine virale (p-value = 2.25×10^{-4}, Exact Fischer test). Il est particulièrement intéressant de remarquer la grande variété des virus ciblant cet interactome. On retrouve des virus associés à une infection aiguë (virus de la rougeole par exemple), des virus associés à une infection chronique (EBV et VHC par exemple), des virus à ADN (HPV par exemple), des virus à ARN (VHC par exemple)… Cette grande variété suggère fortement un rôle de Smurf2 et de ses voisins dans le contrôle de processus cellulaires génériques engagés lors d'une infection virale. Une analyse détaillée des protéines cellulaires ciblées par des protéines virales dans cet interactome centré sur Smurf2 met en évidence le ciblage de plusieurs processus cellulaires :

- la voie de signalisation du TGFβ avec les protéines Smad1, Smad2, Smad3 et TβRI
- la régulation des voies de signalisation de la super-famille du TGFβ avec DAB2, RAC1, RNF11 et RAN
- la réponse immune innée antivirale avec IRF3 et RAC1
- le repliement des glycoprotéines avec la protéine chaperonne CANX
- le trafic membranaire avec la protéine RAB14
- l'épissage de l'ARN avec SFRS4.

Les études disponibles à l'heure actuelle étudient encore peu les liens entre ces différentes protéines et leur ciblage commun par des protéines virales. L'important ciblage de ce réseau et la variété des processus cellulaires associés à ce ciblage ouvre donc de nouvelles pistes de recherche pour mieux comprendre les relations hôte-pathogène. L'analyse de ce sous-réseau souligne le ciblage de la réponse immune innée anti-virale dépendant de la réponse IFN. C'est un mécanisme commun à de nombreux virus. Cette analyse met en évidence le ciblage de la protéine IRF3 (interferon regulatory factor3), une protéine cruciale pour la synthèse d'IFNα par la protéine virale BGFL4 d'EBV (Wang et al., 2009), E6 de HPV16 (Ronco et al., 1998), K9 de l'herpès virus de type 8 (Lin et al., 2001) et la nuclécapside du virus de la rougeole (tenOever et al., 2002), aboutissant à une inhibition de la réponse immune anti-virale associée à cette protéine. L'analyse de cet interactome met aussi en évidence la capacité de certains virus à détourner les fonctions cellulaires à leur profit. Par exemple le VHC détourne la fonction de la protéine CANX dans le repliement des glycoprotéines à son profit en l'utilisant pour le repliement des glycoprotéines d'enveloppe du VHC, E1 et E2 (Choukhi et al., 1998).

Le ciblage de la protéine Smurf2 et de ses voisins par des virus oncogènes tels que HPV16 (Faridi et al., 2011), HPV5 (Ateenyi-Agaba et al., 2010) ou encore EBV (Raab-Traub, 2012) suggère un rôle important de ce réseau dans la carcinogenèse associée à l'infection virale. Les mécanismes associés à la perturbation de la voie de signalisation du TGFβ par des protéines virales divergent selon le type cellulaire étudié. Dans le cas de HPV5, par exemple, la protéine E6 de ce virus interagit avec la protéine Smad3 inhibant ainsi l'activation de la voie de signalisation du TGFβ (Mendoza et al., 2006) et ses effets anti-tumorigènes. Dans ce travail, au contraire, nous avons mis en évidence que le ciblage de la protéine Smurf2 par les

protéines du VHC favorise l'activation de la voie de signalisation du TGFβ apportant ainsi de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes d'induction du CHC par le VHC.

Cette analyse met donc en évidence que même si les mécanismes associés au ciblage de cet interactome divergent selon le virus étudié, le ciblage de la voie de signalisation du TGFβ est un mécanisme important dans la cancérisation viro-induite.

MATERIELS ET METHODES

Culture cellulaire

Sauf indication contraire, les réactifs de culture cellulaire proviennent de Life Technologies. Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO2 dans un milieu Dulbecco Eagle Modified (DMEM), contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAN Biotech). Lorsque cela a été nécessaire, les cellules Huh7 transfectées avec le plasmide d'expression flingate (fusion 3XFlag, PE. Mangeot, INSERM U851, Lyon) ont été traitées avec 1 mg/ml de G418 afin de sélectionner les cellules transfectées.

La ligne de cellules d'hépatome humain Huh9.13, du Pf. R. Bartenschlager (Université de Heidelberg, Allemagne), exprimant le réplicon subgénomique du VHC (NS3-NS5B) de la souche con1 (génotype 1b), a été maintenue dans le même milieu additionné de 1 mg/ml de G418. Les cellules Huh9.13-cured ont été obtenues à partir des cellules Huh9.13 après un mois de traitement avec 500 U/ml d'interféron α2a (Intron A). L'élimination du réplicon dans les cellules Huh9.13-cured a été vérifiée par la détection de NS5A en western blot (fig. 41A).et de NS3 en PCR quantitative (fig. 41B).

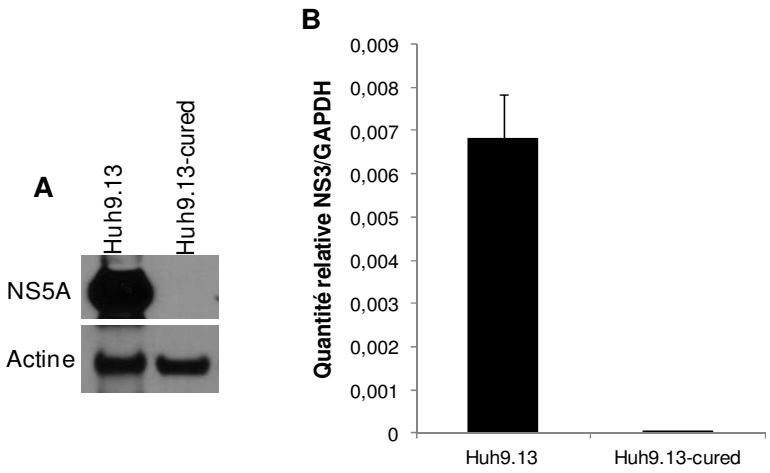


Figure 41 : Elimination du réplicon subgénomique dans la lignée Huh9.13 cured. Après traitement de la lignée Huh9.13 avec l'interféron α2a pendant 1 mois, l'élimination du réplicon subgénomique a été vérifiée par western-blot contre NS5A (A) et par PCR quantitative de NS3 (B)

Constructions plasmidiques

Les ORF de Smurf2 et Smurf2-C716A ont été aimablement fournies par P. Kavsak (Kavsak et al., 2000) (plasmides Addgene 13504 et 13505). L'ORF du récepteur du TGFβ a été aimablement donné par MF. Bourgeade (Inserm U785, Centre hépato-biliaire, Villejuif). Après amplification par PCR en utilisant la KOD polymérase haute-fidélité, les ORF ont été clonées à l'aide du système de recombinaison Gateway® (Life technologies) en pDONR223. Les ORF de Smad3 et Smad4 étaient disponibles au laboratoire en pDONR223 au sein de hORFeome v3.1. Les ORF de Smad2 et Smad7 en pDONR207 ont été aimablement données par Y. Jacob (GPCH Institut Pasteur, Paris). L'ORF de Smurf1 en pDONR221 a été achetée à Life Technologies. Après validation par séquençage, les ORF ont été transférées dans des vecteurs d'expression par des réactions LR: pDEST27 ™ (Life technologies, fusion GST), pCI-neo-3XF (fusion 3XFlag), pGBKT7 (fusion GAL4-BD), pACT2 (fusion GAL4-AD), Flingate (fusion 3XFlag), pDS_X_HA (fusion HA, http://www.signaling-gateway.org).

Les ORF virales avaient été clonées dans pDONR223 au laboratoire (cf ViralORFeome (Pellet et al., 2010)). Le mutant NS3-4A-S139A a été généré par mutagenèse dirigée par B. de Chassey, (Inserm U851, Lyon). Sauf indication contraire, les ORF virales ont été exprimées dans les cellules de mammifères en utilisant le vecteur Flingate.

Double hybride chez la levure

Principe

La technique de double hybride (Chien et al., 1991) chez la levure S. *cerevisiæ* permet d'identifier les interactions entre deux protéines en s'appuyant sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4. La souche de levure AH109 de type MATa contient le gène rapporteur *HIS3* dont l'expression dépend du promoteur Gal1. L'utilisation de ce gène rapporteur auxotrophique permet une visualisation de l'interaction par croissance des colonies de levures

sur un milieu dépourvu d'histidine. S'il y a interaction entre une protéine appât et une protéine proie, le facteur de transcription Gal4 est reconstitué et fonctionnel permettant ainsi la transcription du gène *HIS3* (fig. 43). Les levures deviennent alors capables de métaboliser l'histidine et donc de proliférer sur un milieu sans histidine. Le 3AT est un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3, il est utilisé pour tester la robustesse des interactions trouvées. En effet, si l'interaction est peu robuste la production de l'enzyme HIS3 est faible. La présence de faibles doses de 3AT empêche donc l'enzyme d'exercer son action, les levures sont incapables de métaboliser l'histidine. Au contraire si l'interaction est forte, la production de l'enzyme HIS3 est importante et la présence de 3AT n'empêche pas les levures de proliférer sur un milieu sans histidine, elles sont capables de métaboliser l'histidine.

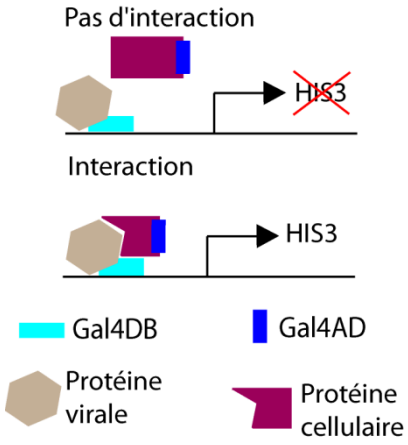


Figure 42 : Principe du double hybride chez la levure. La protéine virale est en fusion avec le domaine Gal4DB, tandis que la protéine cellulaire est en fusion avec le domaine Gal4AD. Lorsque la protéine virale et la protéine cellulaire interagissent, le facteur de transcription Gal4 est actif et va permettre la synthèse du gène his3, les levures sont alors capables de métaboliser l'histidine et donc de proliférer sur un milieu dépourvu d'histidine.

Méthodologie

Les ORF virales de la souche Con1 du VHC ont été clonées dans le plasmide appât Gal4-BD (pGBKT7) et les acteurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGF-β ont été clonés dans le plasmide proie Gal4-AD (pACT2). Les vecteurs appâts et proies ont respectivement été transformés dans les souches de levures AH109 et Y187 (Clontech) par la technique lithium/acétate. Après une pré-culture en milieu riche YPD, les culots de levure ont

été centrifugés à 4000 rpm pendant 5 min, lavés avec de l'eau puis avec une solution de LiAc/TE (LiAc 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM) à deux reprises. Les levures ont ensuite été resuspendues dans un faible volume de LiAc/TE et incubées 10 min. à température ambiante avec 1 µg de plasmide « appât » ou « proie » et 20 µg d'ADN cargo (Salmon testes DNA, Sigma). Une solution de LiAc/TE additionné de PEG 40% a été ajoutée à ce mélange et incubée pendant 30 min. à 30°C. Enfin après addition de DMSO, la transformation des levures a été réalisée par un choc thermique à 42°C pendant 5 min. Les levures ont ensuite été centrifugées et resuspendues en eau avant d'être sélectionnées sur milieu gélosé synthétique SD-L dépourvu de leucine (protéines cellulaires) ou SD-W dépourvu de tryptophane (protéines virales) permettant la prolifération des levures transformées à 30°C en 2 à 3 jours. Les levures transformées ont été cultivées en milieu liquide (SD-L ou SD-W) pendant une nuit à 30°C et croisées sur un milieu riche pendant une nuit. Les levures diploïdes, c'est-à-dire exprimant les deux protéines, ont été sélectionnées sur un milieu SD-LW, puis mises à proliférer en milieu liquide pendant 15 heures avant d'être déposées en gouttes de 5 µL sur un milieu SD-LW dépourvu d'histidine (SD-LW-H) contenant des doses croissantes (0 à 20 mM) de l'inhibiteur compétitif 3-AT (Sigma) .Les interactions positives ont été révélées par les levures proliférant sur ce milieu et la force d'interaction a été estimée par l'addition de doses croissantes de 3-AT.

Transfection des cellules

Vingt-quatre heures après l'ensemencement des cellules, la transfection des cellules avec différents vecteurs d'expression a été réalisée avec le réactif de transfection JetPEI ™ (Polyplus Transfection) selon les recommandations du fabricant après remplacement du milieu de culture par du milieu frais.

Les cellules Huh7, ensemencées dans des plaques à 24 puits, ont été transfectées avec 1 µg de vecteur d'expression de NS3-4A ou contrôle (vecteur vide). La surexpression de Smurf2 a été obtenue par co-transfection de quantités croissantes des vecteurs d'expression de Smurf2 ou Smurf2-C716A (en pCI-neo-3XF). Les cellules Huh9.13 ou Huh9.13-cured ont été transfectées avec 50 ng de vecteur Smurf2 en plaque 24 puits. La quantité de Smurf2 a été proportionnellement augmentée dans les plaques de 12 puits ou de 6 puits.

L'extinction d'expression de Smurf2 a été obtenue par transfection de siRNA dans les cellules Huh7, Huh9.13 ou Huh9.13-cured. Les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif Lipofectamine 2000 (Life technologies) avec 20 pM de siRNA contre SMURF2 ou de siRNA contrôle low GC (Life Technologies). Le milieu de culture a été remplacé 4h plus tard. Et en cas de besoin, les cellules ont été transfectées en utilisant le JetPEI avec 1µg du plasmide d'expression de NS3-4A ou un vecteur contrôle et 0,1 µg de système rapporteur SBE-luciférase. L'efficacité du si-RNA a été vérifiée par western-blot (fig. 43).

L'expression de NS3-4A et de Smurf2 a été confirmée par western blot en utilisant l'anticorps anti-Flag M2 (Sigma).

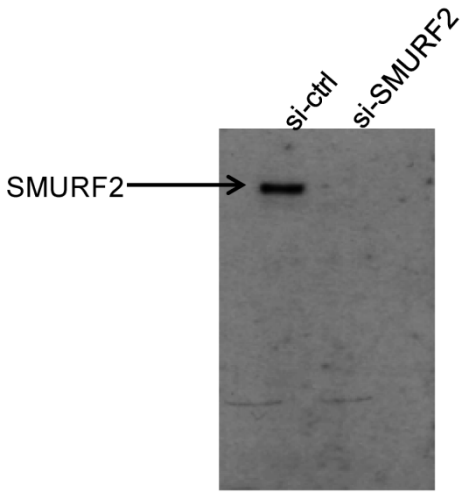


Figure 43 : Vérification de l'efficacité du si-ARN contre Smurf2. Les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide pCi-neo-3XF-Smurf2 et avec le si-ARN contrôle ou le si-ARN contre Smurf2. 24h après les cellules ont été lysées et les lysats analysés par WB avec un anticorps anti-flag

Co-immunoprécipitation en cellules humaines

Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm 24h avant la transfection. Les cellules ont été co-transfectées avec 7,5 µg de plasmide pour les deux partenaires d'interaction (ORF virale dans pDEST27, ORF cellulaire en pCI-neo-3XF). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lysées pendant 20 min sur la glace avec un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal et cocktail inhibiteur de protéases (Sigma)). L'immunoprécipitation a été réalisée avec des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-Flag M2 (Sigma) pendant 2h à 4°C sous rotation. Les protéines ont été éluées et dénaturées en tampon Laemmli 4X, et analysées par SDS-PAGE et Western blot. Les partenaires d'interaction ont été détectés par des anticorps anti-étiquette (anti-Flag M2 et anti-GST, Sigma), conjugués à la HRP.

Etude de la réponse au TGFβ avec le système rapporteur SBE-luciférase

Les cellules ($1.2x10^5$) ont été ensemencées dans des plaques 24 puits et transfectées 24h plus tard, comme indiqué ci-dessus avec 0,1 µg de système rapporteur SBE-luciférase, contenant un plasmide portant le gène rapporteur de la firefly luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant plusieurs sites et un plasmide portant le gène de la renilla luciférase constitutivement exprimée. La stimulation par 2,5 ng/mL de TGFβ humains issus des plaquettes (R&D Systems) a été réalisée 24h après transfection pendant 6h. Les cellules contrôles non stimulées ont été traitées par le véhicule du TGFβ (HCl 4 mM). Lorsque cela est indiqué, 10 µM de l'inhibiteur de Alk4/5/7 (SB431542, Sigma), 1 µM de l'inhibiteur de la protéase NS3-4A (BILN 2061, don du Dr Lamarre, Montréal) ou 0,1 µM des molécules inhibitrices de la dimérisation de NS3-4A (don du Dr Lamarre) ont été ajoutés avant la stimulation TGFβ. Les cellules ont ensuite été lysées avec un tampon de lyse passive et l'activité luciférase mesurée en utilisant le système Dual-Luciferase® Reporter Assay

(Promega). L'activité luciférase est exprimée en unités relatives de luciférase (RLU) c'est à dire par le rapport entre le signal de luminescence pour produit par la firefly luciférase (dépendant du SBE) et celui produit par la Renilla luciférase constitutivement exprimée. Les résultats normalisés ont été calculés en regard de la condition contrôle sans stimulation par le TGFβ.

Etude de la phosphorylation de Smad2 et Smad3

$6x10^5$ cellules Huh7 ont été ensemencées en plaque 6 puits et transfectées avec le vecteur d'expression de NS3-4A ou le vecteur vide et avec ou sans vecteur d'expression de Smurf2. Les cellules ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ pendant les temps indiqués et lysées dans un tampon d'extraction (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Igepal, cocktail inhibiteur de protéases (Sigma)) et 2 mM d'orthovanadate) pendant 20 min sur la glace. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE et analysés avec des anticorps anti-phospho-SMAD2/3 ou des anticorps anti-Smad3 monoclonaux (Epitomics).

Durée de la phosphorylation de Smad2 et Smad3

$6x10^5$ cellules Huh7 ensemencées en plaque 6 puits et transfectées avec le vecteur d'expression de NS3-4A ou le vecteur vide, ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 30min puis lavées avant l'ajout de milieu frais. Les cellules ont été lysées aux temps indiqués (t0= ajout TGFβ) dans un tampon d'extraction (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Igepal, cocktail inhibiteur de protéases (Sigma) et 2 mM d'orthovanadate) pendant 20 min sur la glace. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE et analysés avec des anticorps de lapin anti-phospho-SMAD2/3 ou des anticorps anti-Smad3 monoclonaux (Epitomics).

PCR en temps réel ou PCR quantitative (Q-PCR)

Les cellules ont été ensemencées en plaque 6 puits, 24h avant la stimulation par 2,5 ng/ml de TGFβ ou le véhicule contrôle, pendant 6h. L'ARN a été extrait en utilisant le kit RNeasy (Qiagen). Un µg d'ARN total a été utilisé pour la transcription inverse (RT).

Pour les expériences de Q-PCR, le traitement à la DNase (turbo DNAse, Ambion) a été réalisé après extraction de l'ARN. La RT a été réalisée à l'aide du kit high fidelity RT mix (Life technologies). Les amorces spécifiques décrites dans le tableau 9 ont été utilisées pour l'amplification PCR avec le mastermix SYBR green (Roche) dans un instrument StepOne plus (Applied Biosystems).

Concernant le PCR array (Qiagen), le traitement à la DNase a été réalisé sur la colonne lors de l'extraction de l'ARN. La RT et la Q-PCR ont été réalisées avec les réactifs spécifiques selon les recommandations du fabricant. La RT a été réalisé sur 1 µg d'ARN avec le kit RT² first strand kit. La Q-PCR a ensuite été réalisé avec des primers spécifiques pour 84 gènes relié à l'EMT pré-distribués en plaque 96 (EMT PCR-array, Qiagen) à partir du RT² qPCR mastermix dans un instrument StepOne plus (Applied Biosystems). Les analyses de PCR array ont été réalisées en quadruplicates.

Tableau 9 : listes des amorces utilisées pour la Q-PCR

	Forward	Reverse
PAI-1	5'-CCCAGCTCATCAGCCACT	5'-GAGGTCGACTTCAGTCTCCAG
SMAD7	5'-CGATGGATTTTCTCAAACCAA	5'-AGGGGCCAGATAATTCGTTC
GAPDH	5'-CACCCACTCCTCCACCTTTGAC	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

Immunofluorescence

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre de 12mm de diamètre recouvertes de poly-D-lysine et stimulées 24h plus tard par 2,5 ng/mL de TGFβ ou de véhicule contrôle pendant 48h. Les cellules ont ensuite été fixées avec 4% de PFA, perméabilisées dans du PBS / 0,7% gélatine / 0,025% saponine (PFS) pendant 20 min et

marquées avec la phalloïdine-FITC (Sigma) pendant 40 min. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois en PFS. Quand nécessaire, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-flag-cy3 (Sigma) pendant 1h. Les noyaux ont été marqués avec une solution de Hoechst (Life technologies) pendant 5min. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois en PFS avant le montage des lamelles sur lame à l'aide de milieu de montage DAKO. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal spectral à balayage laser (LSM710, Zeiss).

Cinétique de dégradation de TβRI

L'ORF de TβRI a été clonée dans le vecteur d'expression pDS_X_HA permettant l'expression de TβRI and une étiquette HA du coté C-terminal intracytoplasmique. Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec le plasmide TβRI-HA. Les cellules exprimant TβR-I ont été sélectionnées avec 1 mg/ml de G418.

Les cellules HEK-293 exprimant de façon stable TβRI-HA ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre et transfectées avec le vecteur d'expression de NS3-4A ou le vecteur d'expression contrôle. 24h après la transfection, les cellules ont été incubées 1h dans un milieu sans méthionine/cystéine avant le marquage pendant 30min à 37°C avec 0,5 mCi/ml de ^{35}S-méthionine/cystéine. Après lavages, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ et incubées à 37°C pendant les temps indiqués. Les cellules ont été lavées dans du PBS avant la lyse en tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS et le cocktail inhibiteur de protéases (Sigma)). Le TβR-I a été immunoprécipité avec des anticorps anti-HA couplés à l'agarose (Abcam) après une incubation de 4h à 4°C. Le TβR-I marqué au ^{35}S a été détecté après séparation par SDS-PAGE en utilisant un PhosphoImager (GE Healthcare).

Dosage de TGFβ actif

Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été ensemencées en plaque 24 puits. 24h après, les cellules ont été traitées par le véhicule contrôle pendant 6h. Les surnageants ont été récoltés et stockés à -80°C. Le dosage de TGFβ actif a été réalisé à l'aide du kit « Free Active TGF-β1 » (BioLegends) permettant de doser le TGFβ actif. Le contrôle positif correspond à du milieu supplémenté avec du TGFβ en quantité connue.

Fractionnement subcellulaire

Les cellules Huh7 ont été ensemencées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre. 24h après, les cellules ont été co-transfectées avec les plasmides d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle plus les plasmides d'expression de Smad7 et Smurf2. 48h après transfection, les cellules ont été stimulées avec 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 1h puis lysées avec le tampon (100 mM hepes pH 7,5, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,25 M sucrose, plus cocktail d'inhibiteurs de protéase) pendant 30 min sur la glace. Les lysats ont ensuite été homogénéisés par broyage mécanique et le fractionnement cellulaire a été réalisé par centrifugation séquentielle. Une première centrifugation à 1000g pendant 5 min à 4°C a permis l'isolement des noyaux dans le culot. Une deuxième centrifugation du surnageant à 17 000g pendant 15 min à 4°C a permis l'isolement des membranes intracellulaires (culots). Les surnageants obtenus ont subi une troisième centrifugation à 100 000g pendant 1h à 4°C afin de séparer le cytosol (surnageants) et les membranes plasmiques (culots).

Les protéines des différentes fractions ont ensuite été séparées par SDS-PAGE et analysées par WB avec un anticorps anti-3Xflag directement couplé à la HRP (Sigma).

Purification des radeaux lipidiques

Les cellules HEK-293 exprimant stablement le TβRI-HA (cf « Cinétique de dégradation de TβRI ») ont été ensemencées en flaque T150. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été transfectées avec le plasmide d'expression de NS3-4A ou le plasmide contrôle et un plasmide exprimant la YFP afin de vérifier l'efficacité de transfection. 48h après la transfection, les cellules ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 1h avant la lyse avec le tampon MBS (25 mM MES pH 6,5; NaCl 150 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéase) supplémenté avec 1% de triton X100 pendant 30 min sur la glace. Les lysats ont ensuite été homogénéisés par broyage mécanique. Le fractionnement des lysats a été réalisé par ultracentrifugation à 30 000 rpm pendant 20h à 4°C sur un gradient de saccharose

Après ultracentrifucation, douze fractions de 1mL ont été récupérées. Les fractions 3 à 7, contenant les radeaux lipidiques, ont été concentrées à l'acétone.

Les protéines des différentes fractions ont ensuite été séparées par SDS-PAGE et analysées par WB.

Transcriptome

Les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured ont été ensemencées en plaque 6 puits ($1x10^6$ cellules). 24h après les cellules ont été stimulées par 2,5 ng/mL de TGFβ pendant 6h avant l'extraction d'ARN avec le kit RNeasy (Qiagen). La qualité des ARN de 4 expériences indépendantes a été vérifiée par spectrophotométrie (ratio 260/230 > 1,7). Les ARN ont ensuite été confiés à la société Profil'Expert (Lyon) qui a réalisé l'étude de transcriptome sur des puces Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0.

Bio-informatique

PCR array : après normalisation avec les gènes de ménage (B2M, RPL13A, GAPDH) la modulation de l'expression génique induite par la stimulation TGFβ a été déterminée pour chaque lignée cellulaire en fold change (FC). Les changements sont considérés comme significatifs lorsque les valeurs p (p-value) calculées à l'aide d'un t-test paramétrique modéré sont inférieures ou égales à 0,05.

Transcriptome : l'analyse du transcriptome a été réalisée sur des quadruplicates à l'aide du logiciel d'analyse Genespring. Nous avons étudié la réponse au TGFβ dans les 2 lignées en calculant les FC induits par le TGFβ et nous avons ainsi obtenu des listes de gènes régulés à la hausse ou à la baisse par le TGFβ dans les 2 lignées. Ces listes de gènes ont ensuite été analysées à l'aide de la base de connaissances en ligne DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b). L'ensemble des gènes présent sur la puce Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 a été uitilisé comme référence.

Le voisinage direct de Smurf2 a été extrait de l'interactome humain reconstruit dans la base de données VirHostNet, ainsi que les informations virales ciblant ce réseau (Navratil et al., 2009). Le réseau d'interactions protéiques a été visualisé en utilisant Cytoscape (Shannon et al., 2003). La significativité de l'enrichissement a été déterminée à l'aide d'un test exact de Fisher.

Pour tous les autres résultats, les calculs de significativité ont été réalisés à l'aide d'un test de Student.

REFERENCES

Agaugué, S., Perrin-Cocon, L., André, P., Lotteau, V., 2007. Hepatitis C lipo-Viro-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell. PLoS ONE 2, e330.

Akkari, L., Grégoire, D., Floc'h, N., Moreau, M., Hernandez, C., Simonin, Y., Rosenberg, A.R., Lassus, P., Hibner, U., 2012. Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. J. Hepatol.

Alberstein, M., Zornitzki, T., Zick, Y., Knobler, H., 2012. Hepatitis C core protein impairs insulin downstream signalling and regulatory role of IGFBP-1 expression. J. Viral Hepat. 19, 65–71.

Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., Popper, H., 1978. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. Lancet 1, 459–463.

Alter, M.J., Kruszon-Moran, D., Nainan, O.V., McQuillan, G.M., Gao, F., Moyer, L.A., Kaslow, R.A., Margolis, H.S., 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N. Engl. J. Med. 341, 556–562.

André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchot, C., Paranhos-Baccalà, G., Lotteau, V., 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J. Virol. 76, 6919–6928.

Andrieux, G., Fattet, L., Le Borgne, M., Rimokh, R., Théret, N., 2012. Dynamic regulation of Tgf-B signaling by Tif1γ: a computational approach. PLoS ONE 7, e33761.

Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B., 2003. Making sense of latent TGFβ activation. J Cell Sci 116, 217–224.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 25, 25–29.

Ateenyi-Agaba, C., Franceschi, S., Wabwire-Mangen, F., Arslan, A., Othieno, E., Binta-Kahwa, J., Van Doorn, L.-J., Kleter, B., Quint, W., Weiderpass, E., 2010. Human papillomavirus infection and squamous cell carcinoma of the conjunctiva. Br. J. Cancer 102, 262–267.

Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., Arteaga, C.L., 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. J. Biol. Chem. 275, 36803–36810.

Balzarini, P., Benetti, A., Invernici, G., Cristini, S., Zicari, S., Caruso, A., Gatta, L.B., Berenzi, A., Imberti, L., Zanotti, C., Portolani, N., Giulini, S.M., Ferrari, M., Ciusani, E., Navone, S.E., Canazza, A., Parati, E.A., Alessandri, G., 2012. Transforming growth factor-beta1 induces microvascular abnormalities through a down-modulation of neural cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.

Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., Luga, V., Przulj, N., Robinson, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Jurisica, I., Wrana, J.L., 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. Science 307, 1621–1625.

Battaglia, S., Benzoubir, N., Nobilet, S., Charneau, P., Samuel, D., Zignego, A.L., Atfi, A., Bréchot, C., Bourgeade, M.-F., 2009. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. PLoS ONE 4, e4355.

Bell, H.S., Ryan, K.M., 2008. iASPP inhibition: increased options in targeting the p53 family for cancer therapy. Cancer Res. 68, 4959–4962.

Bellecave, P., Sarasin-Filipowicz, M., Donzé, O., Kennel, A., Gouttenoire, J., Meylan, E., Terracciano, L., Tschopp, J., Sarrazin, C., Berg, T., Moradpour, D., Heim, M.H., 2010. Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. Hepatology 51, 1127–1136.

Bellentani, S., Tiribelli, C., 2001. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. J. Hepatol. 35, 531–537.

Bi, W.-R., Yang, C.-Q., Shi, Q., 2012. Transforming Growth Factor-β1 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatic Fibrosis. Hepatogastroenterology 59, 1960–1963.

Blank, M., Tang, Y., Yamashita, M., Burkett, S.S., Cheng, S.Y., Zhang, Y.E., 2012. A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. Nat Med 18, 227–234.

Brass, V., Berke, J.M., Montserret, R., Blum, H.E., Penin, F., Moradpour, D., 2008. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105, 14545–14550.

Brenndörfer, E.D., Karthe, J., Frelin, L., Cebula, P., Erhardt, A., Schulte am Esch, J., Hengel, H., Bartenschlager, R., Sällberg, M., Häussinger, D., Bode, J.G., 2009. Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. Hepatology 49, 1810–1820.

Bruce, D.L., Macartney, T., Yong, W., Shou, W., Sapkota, G.P., 2012. Protein phosphatase 5 modulates SMAD3 function in the transforming growth factor-β pathway. Cellular Signalling 24, 1999–2006.

Bruce, D.L., Sapkota, G.P., 2012. Phosphatases in SMAD regulation. FEBS Lett. 586, 1897–1905.

Bueno, L., De Alwis, D.P., Pitou, C., Yingling, J., Lahn, M., Glatt, S., Trocóniz, I.F., 2008. Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF-beta kinase antagonist, in mice. Eur. J. Cancer 44, 142–150.

But, D.Y.-K., Lai, C.-L., Yuen, M.-F., 2008. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 14, 1652–1656.

Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C.J., Yang, J., 2011. Snail2 Is an Essential Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis. Cancer Res 71, 245–254.

Cassonnet, P., Rolloy, C., Neveu, G., Vidalain, P.-O., Chantier, T., Pellet, J., Jones, L., Muller, M., Demeret, C., Gaud, G., Vuillier, F., Lotteau, V., Tangy, F., Favre, M., Jacob, Y., 2011. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. Nat. Methods 8, 990–992.

Caunt, M., Mak, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R.K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H.B., Ross, J., Berry, L., Kasman, I., Zlot, C., Cheng, Z., Le Couter, J., Filvaroff, E.H., Plowman, G., Peale, F., French, D., Carano, R., Koch, A.W., Wu, Y., Watts, R.J., Tessier-Lavigne, M., Bagri, A., 2008. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. Cancer Cell 13, 331–342.

Chang, H.-S., Lin, C.-H., Yang, C.-H., Liang, Y.-J., Yu, W.C.Y., 2010. The human papillomavirus-16 (HPV-16) oncoprotein E7 conjugates with and mediates the role of

the transforming growth factor-beta inducible early gene 1 (TIEG1) in apoptosis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42, 1831–1839.
Chen, S.L., Morgan, T.R., 2006. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int J Med Sci 3, 47–52.
Chen, Y.-G., 2009. Endocytic regulation of TGF-β signaling. Cell Research 19, 58–70.
Cheng, P.-L., Chang, M.-H., Chao, C.-H., Lee, Y.-H.W., 2004. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. Oncogene 23, 7821–7838.
Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S., 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9578–9582.
Choi, S.-H., Hwang, S.B., 2006. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. J Biol Chem 281, 7468–7478.
Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M., 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244, 359–362.
Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., Dubuisson, J., 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. J. Virol. 72, 3851–3858.
Chouteau, P., Defer, N., Florimond, A., Caldéraro, J., Higgs, M., Gaudin, A., Mérour, E., Dhumeaux, D., Lerat, H., Pawlotsky, J.-M., 2012. Hepatitis C virus (HCV) protein expression enhances hepatic fibrosis in HCV transgenic mice exposed to a fibrogenic agent. Journal of hepatology.
Chu, A.S., Diaz, R., Hui, J.-J., Yanger, K., Zong, Y., Alpini, G., Stanger, B.Z., Wells, R.G., 2011. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. Hepatology 53, 1685–1695.
Chu, C.-Y., Chang, C.-C., Prakash, E., Kuo, M.-L., 2008. Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression. J. Biomed. Sci. 15, 675–685.
Clemmons, D.R., 1997. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. Cytokine & Growth Factor Reviews 8, 45–62.
Coulouarn, C., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., 2008. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. Hepatology 47, 2059–2067.
Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., Abrignani, S., Valiante, N.M., 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. J. Exp. Med. 195, 35–41.
De Chassey, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaugué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T., Le Breton, M., Pellet, J., Davoust, N., Mangeot, P.E., Chaboud, A., Penin, F., Jacob, Y., Vidalain, P.O., Vidal, M., André, P., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., 2008. Hepatitis C virus infection protein network. Mol Syst Biol 4, 230.
Deng, L., Nagano-Fujii, M., Tanaka, M., Nomura-Takigawa, Y., Ikeda, M., Kato, N., Sada, K., Hotta, H., 2006. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. J Gen Virol 87, 1703–1713.
Derynck, R., Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 425, 577–584.

Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., Wrana, J.L., 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol 5, 410–421.

Diaz, O., Delers, F., Maynard, M., Demignot, S., Zoulim, F., Chambaz, J., Trépo, C., Lotteau, V., André, P., 2006. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. J. Gen. Virol. 87, 2983–2991.

Díaz, R., Kim, J.W., Hui, J.-J., Li, Z., Swain, G.P., Fong, K.S.K., Csiszar, K., Russo, P.A., Rand, E.B., Furth, E.E., Wells, R.G., 2008. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. Hum. Pathol. 39, 102–115.

Divella, R., Daniele, A., Gadaleta, C., Tufaro, A., Venneri, M.T., Paradiso, A., Quaranta, M., 2012. Circulating transforming growth factor-β and epidermal growth factor receptor as related to virus infection in liver carcinogenesis. Anticancer Res. 32, 141–145.

Dooley, S., Hamzavi, J., Ciuclan, L., Godoy, P., Ilkavets, I., Ehnert, S., Ueberham, E., Gebhardt, R., Kanzler, S., Geier, A., Breitkopf, K., Weng, H., Mertens, P.R., 2008. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. Gastroenterology 135, 642–659.

Drabsch, Y., Ten Dijke, P., 2012. TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. Cancer metastasis reviews.

Du, J.X., Hagos, E.G., Nandan, M.O., Bialkowska, A.B., Yu, B., Yang, V.W., 2011. The E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitination regulatory factor 2 negatively regulates Krüppel-like factor 5 protein. J. Biol. Chem. 286, 40354–40364.

Dubuisson, J., 2007. Hepatitis C virus proteins. World J. Gastroenterol. 13, 2406–2415.

Dumoulin, F.L., Von dem Bussche, A., Li, J., Khamzina, L., Wands, J.R., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2003. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. Virology 305, 260–266.

Dupont, S., Inui, M., Newfeld, S.J., 2012. Regulation of TGF-β signal transduction by mono- and deubiquitylation of Smads. FEBS Lett. 586, 1913–1920.

Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., Inui, M., Moro, S., Modena, N., Argenton, F., Newfeld, S.J., Piccolo, S., 2009. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. Cell 136, 123–135.

Dwyer, M.A., Joseph, J.D., Wade, H.E., Eaton, M.L., Kunder, R.S., Kazmin, D., Chang, C., McDonnell, D.P., 2010. WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. Cancer Res. 70, 9298–9308.

Eichhorn, P.J.A., Rodón, L., Gonzàlez-Juncà, A., Dirac, A., Gili, M., Martínez-Sáez, E., Aura, C., Barba, I., Peg, V., Prat, A., Cuartas, I., Jimenez, J., García-Dorado, D., Sahuquillo, J., Bernards, R., Baselga, J., Seoane, J., 2012. USP15 stabilizes TGF-β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-β signaling in glioblastoma. Nat Med 18, 429–435.

El-Serag, H.B., 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 142, 1264–1273.e1.

Eltarhouny, S.A., Elsawy, W.H., Radpour, R., Hahn, S., Holzgreve, W., Zhong, X.Y., 2008. Genes controlling spread of breast cancer to lung “gang of 4”. Exp. Oncol. 30, 91–95.

Erdtmann, L., Franck, N., Lerat, H., Le Seyec, J., Gilot, D., Cannie, I., Gripon, P., Hibner, U., Guguen-Guillouzo, C., 2003. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 278, 18256–18264.

Fagerli, U.-M., Ullrich, K., Stühmer, T., Holien, T., Köchert, K., Holt, R.U., Bruland, O., Chatterjee, M., Nogai, H., Lenz, G., Shaughnessy, J.D., Jr, Mathas, S., Sundan, A., Bargou, R.C., Dörken, B., Børset, M., Janz, M., 2011. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. Oncogene 30, 3198–3206.

Falleti, E., Fabris, C., Toniutto, P., Fontanini, E., Cussigh, A., Bitetto, D., Fornasiere, E., Avellini, C., Minisini, R., Pirisi, M., 2008. TGF-beta1 genotypes in cirrhosis: relationship with the occurrence of liver cancer. Cytokine 44, 256–261.

Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., Idrees, M., 2011. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. Virol. J. 8, 269.

Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland, P.V., 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N. Engl. J. Med. 292, 767–770.

Feng, X.-H., Derynck, R., 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21, 659–693.

Firrincieli, D., Boissan, M., Chignard, N., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. Gastroentérologie Clinique et Biologique 34, 523–528.

Fischer, A.N.M., Fuchs, E., Mikula, M., Huber, H., Beug, H., Mikulits, W., 2007. PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. Oncogene 26, 3395–3405.

Flanders, K.C., 2004. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. Int J Exp Pathol 85, 47–64.

Fykerud, T.A., Kjenseth, A., Schink, K.O., Sirnes, S., Bruun, J., Omori, Y., Brech, A., Rivedal, E., Leithe, E., 2012. Smad ubiquitination regulatory factor-2 controls gap junction intercellular communication by modulating endocytosis and degradation of connexin43. Journal of cell science.

Gabriel, A., Ziólkowski, A., Radlowski, P., Tomaszek, K., Dziambor, A., 2008. Hepatocyte steatosis in HCV patients promotes fibrosis by enhancing TGF-beta liver expression. Hepatol Res 38, 141–146.

Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Massagué, J., 2009. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. Mol. Cell 36, 457–468.

Gewaltig, J., Mangasser-Stephan, K., Gartung, C., Biesterfeld, S., Gressner, A.M., 2002. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. Clin Chim Acta 316, 83–94.

Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B., 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology 49, 1335–1374.

Giannelli, G., Bergamini, C., Fransvea, E., Sgarra, C., Antonaci, S., 2005. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 129, 1375–1383.

Giannelli, G., Mazzocca, A., Fransvea, E., Lahn, M., Antonaci, S., 2011. Inhibiting TGF-β signaling in hepatocellular carcinoma. Biochim. Biophys. Acta 1815, 214–223.

Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., Siddiqui, A., 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 9599–9604.

Gotzmann, J., Fischer, A.N.M., Zojer, M., Mikula, M., Proell, V., Huber, H., Jechlinger, M., Waerner, T., Weith, A., Beug, H., Mikulits, W., 2006. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. Oncogene 25, 3170–3185.

Grandclement, C., Pallandre, J.R., Valmary Degano, S., Viel, E., Bouard, A., Balland, J., Rémy-Martin, J.-P., Simon, B., Rouleau, A., Boireau, W., Klagsbrun, M., Ferrand, C., Borg, C., 2011. Neuropilin-2 expression promotes TGF-β1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. PLoS ONE 6, e20444.

Gressner, A., Dooley, S., Weiskirchen, R., 2005. Tgf-β and the Smad Pathway in Liver Fibrogenesis, in: Dufour, J.-F., Clavien, P.-A., Trautwein, C., Graf, R. (Eds.), Signaling Pathways in Liver Diseases. Springer Berlin Heidelberg, pp. 139–150.

Gunaratne, A., Benchabane, H., Di Guglielmo, G.M., 2012. Regulation of TGFβ receptor trafficking and signaling by atypical protein kinase C. Cell. Signal. 24, 119–130.

Guo, X., Wang, X.-F., 2009. Signaling cross-talk between TGF-β/BMP and other pathways. Cell Research 19, 71–88.

Han, Y.-P., 2006. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. J Gastroenterol Hepatol 21, S88–S91.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr, Wrana, J.L., Falb, D., 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell 89, 1165–1173.

He, W., Dorn, D.C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M.A.S., Massagué, J., 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. Cell 125, 929–941.

Heldin, C.-H., Landström, M., Moustakas, A., 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Curr. Opin. Cell Biol. 21, 166–176.

Heldin, C.-H., Moustakas, A., 2012. Role of Smads in TGFβ signaling. Cell Tissue Res. 347, 21–36.

Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., Moustakas, A., 2012. Regulation of EMT by TGFβ in cancer. FEBS Lett. 586, 1959–1970.

Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H., Yoshikura, H., 1993. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. J. Virol. 67, 1953–1958.

Hill, C.S., 2006. Identification of a Smad Phosphatase. ACS Chem. Biol. 1, 346–348.

Horbelt, D., Denkis, A., Knaus, P., 2012. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 469–474.

Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S.L., Kumada, H., Llovet, J.M., Golub, T.R., 2009. Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res 69, 7385–7392.

Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4, 44–57.

Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009b. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 37, 1–13.

Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramière, C., Bartenschlager, R., Penin, F., Lotteau, V., André, P., 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. PLoS ONE 4, e4233.

Ishiguro, S., Inoue, M., Tanaka, Y., Mizokami, M., Iwasaki, M., Tsugane, S., 2011. Impact of viral load of hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based cohort study (JPHC Study). Cancer Lett 300, 173–179.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H., Matsuzawa, Y., 1995. Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 89, 45–48.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Takaishi, K., Shirai, Y., Kiso, S., Yabuuchi, I., Matsuda, Y., Nishioka, M., Tarui, S., 1991. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 51, 4080–4083.

Itoh, S., Itoh, F., 2011. Inhibitory machinery for the TGF-β family signaling pathway. Growth Factors 29, 163–173.

Iwaki, T., Urano, T., Umemura, K., 2012. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. Br J Haematol 157, 291–298.

Izzi, L., Attisano, L., 2004. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. Oncogene 23, 2071–2078.

Jiang, Z., Wang, Z., Xu, Y., Wang, B., Huang, W., Cai, S., 2010. Analysis of RGS2 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. Biosci. Rep. 30, 383–390.

Jin, C., Yang, Y., Anver, M.R., Morris, N., Wang, X., Zhang, Y.E., 2009. Smad Ubiquitination Regulatory Factor 2 Promotes Metastasis of Breast Cancer Cells by Enhancing Migration and Invasiveness. Cancer Res 69, 735–740.

Jin, W., Chen, B., Li, J., Zhu, H., Huang, M., Gu, S., Wang, Q., Chen, J., Yu, S., Wu, J., Shao, Z., 2012. TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway. Mol. Cell. Biol. 32, 50–63.

Joyce, M.A., Tyrrell, D.L.J., 2010. The cell biology of hepatitis C virus. Microbes Infect. 12, 263–271.

Kamal, S.M., Turner, B., He, Q., Rasenack, J., Bianchi, L., Al Tawil, A., Nooman, A., Massoud, M., Koziel, M.J., Afdhal, N.H., 2006. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. Hepatology 43, 771–779.

Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., Iwamoto, Y., Kawamori, R., Kikkawa, R., Nakamura, Y., Maeda, S., 2004. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. Am. J. Hum. Genet. 75, 832–843.

Kane, N.M., Jones, M., Brosens, J.J., Kelly, R.W., Saunders, P.T.K., Critchley, H.O.D., 2010. TGFβ1 attenuates expression of prolactin and IGFBP-1 in decidualized endometrial stromal cells by both SMAD-dependent and SMAD-independent pathways. PLoS ONE 5, e12970.

Kanzler, S., Lohse, A.W., Keil, A., Henninger, J., Dienes, H.P., Schirmacher, P., Rose-John, S., Zum Büschenfelde, K.H., Blessing, M., 1999. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. Am. J. Physiol. 276, G1059–1068.

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Mol Cell 6, 1365–1375.

Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Rice, C.M., Murcko, M.A., Caron, P.R., Thomson, J.A., 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. Cell 87, 343–355.

Kim, M., Lee, H.C., Tsedensodnom, O., Hartley, R., Lim, Y.-S., Yu, E., Merle, P., Wands, J.R., 2008. Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. J. Hepatol. 48, 780–791.

Komurasaki, T., Toyoda, H., Uchida, D., Nemoto, N., 2002. Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes. Growth Factors 20, 61–69.

Kovalenko, E., Tacke, F., Gressner, O.A., Zimmermann, H.W., Lahme, B., Janetzko, A., Wiederholt, T., Berg, T., Müller, T., Trautwein, C., Gressner, A.M., Weiskirchen, R., 2009. Validation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) and its gene polymorphisms as noninvasive biomarkers for the assessment of liver fibrosis. J. Viral Hepat. 16, 612–620.

Kumar, D., Whiteside, T.L., Kasid, U., 2000. Identification of a Novel Tumor Necrosis Factor-α-inducible Gene, SCC-S2, Containing the Consensus Sequence of a Death Effector Domain of Fas-associated Death Domain-like Interleukin- 1β-converting Enzyme-inhibitory Protein. J. Biol. Chem. 275, 2973–2978.

Kwun, H.J., Jung, E.Y., Ahn, J.Y., Lee, M.N., Jang, K.L., 2001. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. J. Gen. Virol. 82, 2235–2241.

Laska, M.J., Lowe, S.W., Zender, L., Hearn, S., Vogel, U., Jensen, U.B., Bric, A., Nexø, B.A., 2009. Enforced expression of PPP1R13L increases tumorigenesis and invasion through p53-dependent and p53-independent mechanisms. Mol. Carcinog. 48, 832–842.

Lee, T.K., Poon, R.T.P., Yuen, A.P., Ling, M.T., Kwok, W.K., Wang, X.H., Wong, Y.C., Guan, X.Y., Man, K., Chau, K.L., Fan, S.T., 2006. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. Clin. Cancer Res. 12, 5369–5376.

Lefebvre, D.L., Rosen, C.F., 2005. Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses. Biochim. Biophys. Acta 1724, 71–85.

Legembre, P., Schickel, R., Barnhart, B.C., Peter, M.E., 2004. Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. J. Biol. Chem. 279, 46742–46747.

Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V., Hill, C.S., 2007. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. Mol. Cell. Biol. 27, 6068–6083.

Lewitt, M.S., Hilding, A., Ostenson, C.-G., Efendic, S., Brismar, K., Hall, K., 2008. Insulin-like growth factor-binding protein-1 in the prediction and development of type 2 diabetes in middle-aged Swedish men. Diabetologia 51, 1135–1145.

Li, B., Li, X., Li, Y., Guo, H., Sun, S.-Y., He, Q.-Q., Wang, Y., Luo, J., Wen, J.-F., Zheng, H., Feng, D.-Y., 2010a. The effects of hepatitis C virus non-structural protein 3 on cell growth mediated by extracellular signal-related kinase cascades in human hepatocytes in vitro. Int. J. Mol. Med. 26, 273–279.

Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr, Lemon, S.M., 2005a. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 2992–2997.

Li, T., Li, D., Cheng, L., Wu, H., Gao, Z., Liu, Z., Jiang, W., Gao, Y.H., Tian, F., Zhao, L., Wang, S., 2010b. Epithelial-mesenchymal transition induced by hepatitis C virus core protein in cholangiocarcinoma. Ann. Surg. Oncol. 17, 1937–1944.

Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., Chen, Z.J., 2005b. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 17717–17722.

Liang, M., Melchior, F., Feng, X.-H., Lin, X., 2004. Regulation of Smad4 sumoylation and transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT1. J. Biol. Chem. 279, 22857–22865.

Lin, B.L., Xie, D.Y., Xie, S.B., Xie, J.Q., Zhang, X.H., Zhang, Y.F., Gao, Z.L., 2011. Down-regulation of iASPP in human hepatocellular carcinoma cells inhibits cell proliferation and tumor growth. Neoplasma 58, 205–210.

Lin, R., Genin, P., Mamane, Y., Sgarbanti, M., Battistini, A., Harrington, W.J., Jr, Barber, G.N., Hiscott, J., 2001. HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. Oncogene 20, 800–811.

Lin, W., Tsai, W.-L., Shao, R.-X., Wu, G., Peng, L.F., Barlow, L.L., Chung, W.J., Zhang, L., Zhao, H., Jang, J.-Y., Chung, R.T., 2010. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. Gastroenterology 138, 2509–2518, 2518.e1.

Lin, W., Weinberg, E.M., Tai, A.W., Peng, L.F., Brockman, M.A., Kim, K.-A., Kim, S.S., Borges, C.B., Shao, R.-X., Chung, R.T., 2008. HIV increases HCV replication in a TGF-beta1-dependent manner. Gastroenterology 134, 803–811.

Lin, X., Duan, X., Liang, Y.-Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., Shi, Y., Chen, Y.-G., Meng, A., Feng, X.-H., 2006. PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGFβ Signaling. Cell 125, 915–928.

Lin, X., Liang, M., Feng, X.-H., 2000. Smurf2 Is a Ubiquitin E3 Ligase Mediating Proteasome-dependent Degradation of Smad2 in Transforming Growth Factor-β Signaling. J Biol Chem 275, 36818 –36822.

Lin, Z.-S., Chu, H.-C., Yen, Y.-C., Lewis, B.C., Chen, Y.-W., 2012. Krüppel-Like Factor 4, a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells Reverts Epithelial Mesenchymal Transition by Suppressing Slug Expression. PLoS One 7.

Liu, C., Gaça, M.D.A., Swenson, E.S., Vellucci, V.F., Reiss, M., Wells, R.G., 2003. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. J. Biol. Chem. 278, 11721–11728.

Liu, F., Matsuura, I., 2005. Inhibition of Smad antiproliferative function by CDK phosphorylation. Cell Cycle 4, 63–66.

Llinàs-Brunet, M., Bailey, M.D., Bolger, G., Brochu, C., Faucher, A.-M., Ferland, J.M., Garneau, M., Ghiro, E., Gorys, V., Grand-Maître, C., Halmos, T., Lapeyre-Paquette, N., Liard, F., Poirier, M., Rhéaume, M., Tsantrizos, Y.S., Lamarre, D., 2004. Structure-activity study on a novel series of macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease leading to the discovery of BILN 2061. J Med Chem 47, 1605–1608.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285, 110–113.

Lonardo, E., Hermann, P.C., Mueller, M.-T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcala, S., Rodriguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J.C., Torres-Ruíz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrián, D.Á., Heuchel, R., Löhr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., Heeschen, C., 2011. Nodal/Activin signaling drives self-renewal and

tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. Cell Stem Cell 9, 433–446.
Long, J., Wang, G., He, D., Liu, F., 2004. Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. Biochem. J. 379, 23–29.
Lu, B., Guo, H., Zhao, J., Wang, C., Wu, G., Pang, M., Tong, X., Bu, F., Liang, A., Hou, S., Fan, X., Dai, J., Wang, H., Guo, Y., 2010. Increased expression of iASPP, regulated by hepatitis B virus X protein-mediated NF-κB activation, in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 139, 2183–2194.e5.
Luo, K., 2004. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. Curr. Opin. Genet. Dev. 14, 65–70.
Macdonald, A., Harris, M., 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. J. Gen. Virol. 85, 2485–2502.
Malizia, A.P., Lacey, N., Walls, D., Egan, J.J., Doran, P.P., 2009. CUX1/Wnt signaling regulates Epithelial Mesenchymal Transition in EBV infected epithelial cells. Exp Cell Res 315, 1819–1831.
Malone, J.H., Oliver, B., 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. BMC Biol. 9, 34.
Marquez, R.T., Bandyopadhyay, S., Wendlandt, E.B., Keck, K., Hoffer, B.A., Icardi, M.S., Christensen, R.N., Schmidt, W.N., McCaffrey, A.P., 2010. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. Lab. Invest. 90, 1727–1736.
Massagué, J., 2012. TGFβ signalling in context. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13, 616–630.
Massagué, J., Chen, Y.G., 2000. Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev 14, 627–644.
Massagué, J., Seoane, J., Wotton, D., 2005. Smad transcription factors. Genes Dev. 19, 2783–2810.
Massard, J., Ratziu, V., Thabut, D., Moussalli, J., Lebray, P., Benhamou, Y., Poynard, T., 2006. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. J. Hepatol. 44, S19–24.
Matsuzaki, K., Murata, M., Yoshida, K., Sekimoto, G., Uemura, Y., Sakaida, N., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Fujisawa, J., Okazaki, K., Seki, T., 2007. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatology 46, 48–57.
Mavrakis, K.J., Andrew, R.L., Lee, K.L., Petropoulou, C., Dixon, J.E., Navaratnam, N., Norris, D.P., Episkopou, V., 2007. Arkadia enhances Nodal/TGF-beta signaling by coupling phospho-Smad2/3 activity and turnover. PLoS Biol. 5, e67.
Mazzocca, A., Fransvea, E., Dituri, F., Lupo, L., Antonaci, S., Giannelli, G., 2010. Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor beta blocks the tumor-stroma cross-talk and tumor progression in hepatocellular carcinoma. Hepatology 51, 523–534.
McGivern, D.R., Lemon, S.M., 2011. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. Oncogene 30, 1969–1983.
Mehta, S.H., Brancati, F.L., Strathdee, S.A., Pankow, J.S., Netski, D., Coresh, J., Szklo, M., Thomas, D.L., 2003. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. Hepatology 38, 50–56.
Meindl-Beinker, N.M., Dooley, S., 2008. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. J. Gastroenterol. Hepatol. 23 Suppl 1, S122–127.

Mendoza, J.-A., Jacob, Y., Cassonnet, P., Favre, M., 2006. Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. J. Virol 80, 12420–12424.

Meyer, C., Godoy, P., Bachmann, A., Liu, Y., Barzan, D., Ilkavets, I., Maier, P., Herskind, C., Hengstler, J.G., Dooley, S., 2011. Distinct role of endocytosis for Smad and non-Smad TGF-β signaling regulation in hepatocytes. J. Hepatol. 55, 369–378.

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., Tschopp, J., 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. Nature 437, 1167–1172.

Miura, K., Taura, K., Kodama, Y., Schnabl, B., Brenner, D.A., 2008. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. Hepatology 48, 1420–1429.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., Miyazaki, K., 2005. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Br. J. Cancer 92, 252–258.

Mo, J.-S., Ann, E.-J., Yoon, J.-H., Jung, J., Choi, Y.-H., Kim, H.-Y., Ahn, J.-S., Kim, S.-M., Kim, M.-Y., Hong, J.-A., Seo, M.-S., Lang, F., Choi, E.-J., Park, H.-S., 2011. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. J. Cell. Sci. 124, 100–112.

Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. Nat. Rev. Microbiol. 5, 453–463.

Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., Moradpour, D., 2011. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. J. Viral Hepat. 18, 305–315.

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., Koike, K., 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Nat. Med. 4, 1065–1067.

Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Todoroki, T., Kimura, S., Koike, K., 2001. Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C Virus-associated Hepatocarcinogenesis. Cancer Res 61, 4365–4370.

Morsut, L., Yan, K.-P., Enzo, E., Aragona, M., Soligo, S.M., Wendling, O., Mark, M., Khetchoumian, K., Bressan, G., Chambon, P., Dupont, S., Losson, R., Piccolo, S., 2010. Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. Development 137, 2571–2578.

Nagano, Y., Mavrakis, K.J., Lee, K.L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K., Miyazawa, K., 2007. Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. J. Biol. Chem. 282, 20492–20501.

Namiki, T., Coelho, S.G., Hearing, V.J., 2011a. NUAK2: an emerging acral melanoma oncogene. Oncotarget 2, 695–704.

Namiki, T., Tanemura, A., Valencia, J.C., Coelho, S.G., Passeron, T., Kawaguchi, M., Vieira, W.D., Ishikawa, M., Nishijima, W., Izumo, T., Kaneko, Y., Katayama, I., Yamaguchi, Y., Yin, L., Polley, E.C., Liu, H., Kawakami, Y., Eishi, Y., Takahashi, E., Yokozeki, H., Hearing, V.J., 2011b. AMP kinase-related kinase NUAK2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 6597–6602.

Navratil, V., De Chassey, B., Meyniel, L., Delmotte, S., Gautier, C., Andre, P., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C., 2009. VirHostNet: a knowledge base for the management and the analysis of proteome-wide virus-host interaction networks. Nucleic Acids Res. 37, D661–D668.

Ng, T.I., Mo, H., Pilot-Matias, T., He, Y., Koev, G., Krishnan, P., Mondal, R., Pithawalla, R., He, W., Dekhtyar, T., Packer, J., Schurdak, M., Molla, A., 2007. Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. Hepatology 45, 1413–1421.

Niessen, K., Fu, Y., Chang, L., Hoodless, P.A., McFadden, D., Karsan, A., 2008. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. J. Cell Biol. 182, 315–325.

Nishioka, M., Ueno, K., Hazama, S., Okada, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Okayama, N., Hirata, H., Oka, M., Imai, K., Dahiya, R., Hinoda, Y., 2011. Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. Molecular carcinogenesis.

Notari, M., Hu, Y., Koch, S., Lu, M., Ratnayaka, I., Zhong, S., Baer, C., Pagotto, A., Goldin, R., Salter, V., Candi, E., Melino, G., Lu, X., 2011. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 16645–16650.

Núñez, O., Fernández-Martínez, A., Majano, P.L., Apolinario, A., Gómez-Gonzalo, M., Benedicto, I., López-Cabrera, M., Boscá, L., Clemente, G., García-Monzón, C., Martín-Sanz, P., 2004. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. Gut 53, 1665–1672.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., Wrana, J.L., 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. Science 307, 1603–1609.

Padua, D., Massagué, J., 2009. Roles of TGFbeta in metastasis. Cell Res. 19, 89–102.

Padua, D., Zhang, X.H.-F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R., Massagué, J., 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. Cell 133, 66–77.

Paradis, V., Mathurin, P., Laurent, A., Charlotte, F., Vidaud, M., Poynard, T., Hoang, C., Opolon, P., Bedossa, P., 1996. Histological features predictive of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. J. Clin. Pathol. 49, 998–1004.

Parvaiz, F., Manzoor, S., Tariq, H., Javed, F., Fatima, K., Qadri, I., 2011. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to insulin resistance. Virol. J. 8, 474.

Paulino, A.D., Ubhi, K., Rockenstein, E., Adame, A., Crews, L., Letendre, S., Ellis, R., Everall, I.P., Grant, I., Masliah, E., 2011. Neurotoxic effects of the HCV core protein are mediated by sustained activation of ERK via TLR2 signaling. J. Neurovirol. 17, 327–340.

Pavio, N., Battaglia, S., Boucreux, D., Arnulf, B., Sobesky, R., Hermine, O., Brechot, C., 2005. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. Oncogene 24, 6119–6132.

Pawlotsky, J.-M., 2002. Le virus de l'hépatite C. médecine/sciences 18, 303–314.

Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S.K., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., Portillo, F., 2005. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. EMBO J. 24, 3446–3458.

Pellet, J., Tafforeau, L., Lucas-Hourani, M., Navratil, V., Meyniel, L., Achaz, G., Guironnet-Paquet, A., Aublin-Gex, A., Caignard, G., Cassonnet, P., Chaboud, A., Chantier, T.,

Deloire, A., Demeret, C., Le Breton, M., Neveu, G., Jacotot, L., Vaglio, P., Delmotte, S., Gautier, C., Combet, C., Deleage, G., Favre, M., Tangy, F., Jacob, Y., Andre, P., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C., Vidalain, P.O., 2010. ViralORFeome: an integrated database to generate a versatile collection of viral ORFs. Nucleic Acids Res. 38, D371–378.

Perrin-Cocon, L., Agaugué, S., Diaz, O., Vanbervliet, B., Dollet, S., Guironnet-Paquet, A., André, P., Lotteau, V., 2008. Th1 disabled function in response to TLR4 stimulation of monocyte-derived DC from patients chronically-infected by hepatitis C virus. PLoS ONE 3, e2260.

Petit, J.M., Benichou, M., Duvillard, L., Jooste, V., Bour, J.B., Minello, A., Verges, B., Brun, J.M., Gambert, P., Hillon, P., 2003. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. Am. J. Gastroenterol. 98, 1150–1154.

Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C., Lindenbach, B.D., 2009. Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. J. Virol. 83, 8379–8395.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., Bartenschlager, R., 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. J. Virol. 75, 1252–1264.

Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hézode, C., Pawlotsky, J.-M., 2008. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. Hepatology 48, 16–27.

Poordad, F., Dieterich, D., 2012. Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. Journal of Viral Hepatitis 19, 449–464.

Presser, L.D., Haskett, A., Waris, G., 2011. Hepatitis C virus-induced furin and thrombospondin-1 activate TGF-β1: role of TGF-β1 in HCV replication. Virology 412, 284–296.

Prud'homme, G.J., Glinka, Y., 2012. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. Oncotarget.

Raab-Traub, N., 2012. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. Curr Opin Virol 2, 453–458.

Ramesh, S., Qi, X.-J., Wildey, G.M., Robinson, J., Molkentin, J., Letterio, J., Howe, P.H., 2008. TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. EMBO Rep. 9, 990–997.

Ramkumar, C., Kong, Y., Cui, H., Hao, S., Jones, S.N., Gerstein, R.M., Zhang, H., 2012. Smurf2 regulates the senescence response and suppresses tumorigenesis in mice. Cancer Res. 72, 2714–2719.

Ray, R.B., Lagging, L.M., Meyer, K., Ray, R., 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. J. Virol. 70, 4438–4443.

Ray, S., Broor, S.L., Vaishnav, Y., Sarkar, C., Girish, R., Dar, L., Seth, P., Broor, S., 2003. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. J Gastroenterol Hepatol 18, 393–403.

Rehermann, B., 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. J Clin Invest 119, 1745–1754.

Reichl, P., Haider, C., Grubinger, M., Mikulits, W., 2012. TGF-β in Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. Current pharmaceutical design.

Ribeiro, A., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Urrutia, R., Gores, G.J., 1999. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. Hepatology 30, 1490–1497.

Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin-i, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., Weiner, A., 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. Archives of Virology 143, 2493–2503.

Romero-Gomez, M., Eslam, M., Ruiz, A., Maraver, M., 2011. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. Liver Int. 31, 443–460.

Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., Howley, P.M., 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev. 12, 2061–2072.

Rowe, R.G., Lin, Y., Shimizu-Hirota, R., Hanada, S., Neilson, E.G., Greenson, J.K., Weiss, S.J., 2011. Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression. Mol. Cell. Biol. 31, 2392–2403.

Rygiel, K.A., Robertson, H., Marshall, H.L., Pekalski, M., Zhao, L., Booth, T.A., Jones, D.E.J., Burt, A.D., Kirby, J.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. Lab. Invest. 88, 112–123.

Sabile, A., Perlemuter, G., Bono, F., Kohara, K., Demaugre, F., Kohara, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Bréchot, C., Barba, G., 1999. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. Hepatology 30, 1064–1076.

Said, N.A.B.M., Williams, E.D., 2011. Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis. Cells Tissues Organs 193, 85–97.

Saitoh, T., Katoh, M., 2002. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. Int. J. Mol. Med. 10, 345–349.

Sandhu, M.S., Heald, A.H., Gibson, J.M., Cruickshank, J.K., Dunger, D.B., Wareham, N.J., 2002. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. Lancet 359, 1740–1745.

Sarrazin, C., Hézode, C., Zeuzem, S., Pawlotsky, J.-M., 2012. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. J. Hepatol. 56 Suppl 1, S88–100.

Schmitz, K.J., Wohlschlaeger, J., Lang, H., Sotiropoulos, G.C., Malago, M., Steveling, K., Reis, H., Cicinnati, V.R., Schmid, K.W., Baba, H.A., 2008. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. J. Hepatol. 48, 83–90.

Scholten, D., Osterreicher, C.H., Scholten, A., Iwaisako, K., Gu, G., Brenner, D.A., Kisseleva, T., 2010. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. Gastroenterology 139, 987–998.

Scholtes, C., Ramière, C., Rainteau, D., Perrin-Cocon, L., Wolf, C., Humbert, L., Carreras, M., Guironnet-Paquet, A., Zoulim, F., Bartenschlager, R., Lotteau, V., André, P., Diaz, O., 2012. High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. Hepatology 56, 39–48.

Schulze-Krebs, A., Preimel, D., Popov, Y., Bartenschlager, R., Lohmann, V., Pinzani, M., Schuppan, D., 2005. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. Gastroenterology 129, 246–258.

Schuppan, D., Krebs, A., Bauer, M., Hahn, E.G., 2003. Hepatitis C and liver fibrosis. Cell Death Differ. 10 Suppl 1, S59–67.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. Genome Res. 13, 2498–2504.

Shi, S.T., Polyak, S.J., Tu, H., Taylor, D.R., Gretch, D.R., Lai, M.M.C., 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. Virology 292, 198–210.

Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., Cao, X., 2004. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. J. Cell Biol. 164, 291–300.

Shi, Y., Massagué, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 113, 685–700.

Shin, J.Y., Hur, W., Wang, J.S., Jang, J.W., Kim, C.W., Bae, S.H., Jang, S.K., Yang, S.-H., Sung, Y.C., Kwon, O.-J., Yoon, S.K., 2005. HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1. Exp. Mol. Med. 37, 138–145.

Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S., Matsuzawa, Y., 1994. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. Cancer 73, 2275–2279.

Shirasawa, S., Sugiyama, S., Baba, I., Inokuchi, J., Sekine, S., Ogino, K., Kawamura, Y., Dohi, T., Fujimoto, M., Sasazuki, T., 2004. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 13921–13926.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.-M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.-J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 42, 962–973.

Song, K.-D., Kim, D.-J., Lee, J.E., Yun, C.-H., Lee, W.K., 2012. KLF10, transforming growth factor-β-inducible early gene 1, acts as a tumor suppressor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 419, 388–394.

Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. PLoS Pathog. 3, e103.

Strizzi, L., Hardy, K.M., Kirschmann, D.A., Ahrlund-Richter, L., Hendrix, M.J.C., 2012. Nodal expression and detection in cancer: experience and challenges. Cancer Res. 72, 1915–1920.

Stumpf, M.P.H., Thorne, T., De Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., Wiuf, C., 2008. Estimating the size of the human interactome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 6959–6964.

Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., Tonks, N.K., 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. Cell 75, 487–493.

Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., Miyazono, K., 2002. Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane ,. J. Biol. Chem. 277, 39919–39925.

Szmulewitz, R.Z., Chung, E., Al-Ahmadie, H., Daniel, S., Kocherginsky, M., Razmaria, A., Zagaja, G.P., Brendler, C.B., Stadler, W.M., Conzen, S.D., 2012. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 expression in primary human prostate cancers. Prostate 72, 157–164.

Tache, D., Bogdan, F., Pisoschi, C., Baniță, M., Stănciulescu, C., Fusaru, A.M., Comănescu, V., 2011. Evidence for the involvement of TGF-β1-CTGF axis in liver fibrogenesis secondary to hepatic viral infection. Rom J Morphol Embryol 52, 409–412.

Tang, L.-Y., Yamashita, M., Coussens, N.P., Tang, Y., Wang, X., Li, C., Deng, C.-X., Cheng, S.Y., Zhang, Y.E., 2011. Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. EMBO J. 30, 4777–4789.

Tang, L.-Y., Zhang, Y.E., 2011. Non-degradative ubiquitination in Smad-dependent TGF-β signaling. Cell Biosci 1, 43.

Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M., Brenner, D.A., 2010. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. Hepatology 51, 1027–1036.

Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M., 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. Science 285, 107–110.

tenOever, B.R., Servant, M.J., Grandvaux, N., Lin, R., Hiscott, J., 2002. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. J. Virol. 76, 3659–3669.

Thibeault, D., Massariol, M.-J., Zhao, S., Welchner, E., Goudreau, N., Gingras, R., Llinàs-Brunet, M., White, P.W., 2009. Use of the fused NS4A peptide-NS3 protease domain to study the importance of the helicase domain for protease inhibitor binding to hepatitis C virus NS3-NS4A. Biochemistry 48, 744–753.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 139, 871–890.

Thomas, D.L., Astemborski, J., Rai, R.M., Anania, F.A., Schaeffer, M., Galai, N., Nolt, K., Nelson, K.E., Strathdee, S.A., Johnson, L., Laeyendecker, O., Boitnott, J., Wilson, L.E., Vlahov, D., 2000. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. JAMA 284, 450–456.

Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Köchel, H.G., Uy, A., 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. Med. Microbiol. Immunol. 181, 293–300.

Thomssen, R., Bonk, S., Thiele, A., 1993. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. Med. Microbiol. Immunol. 182, 329–334.

Topczewska, J.M., Postovit, L.-M., Margaryan, N.V., Sam, A., Hess, A.R., Wheaton, W.W., Nickoloff, B.J., Topczewski, J., Hendrix, M.J.C., 2006. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. Nature Medicine 12, 925–932.

Toyama, T., Lee, H.C., Koga, H., Wands, J.R., Kim, M., 2010. Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. Mol. Cancer Res. 8, 254–265.

Tran, G., 2008. The role of hepatitis C virus in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Bioscience Horizons.

Tsai, W.-L., Chung, R.T., 2010. Viral hepatocarcinogenesis. Oncogene 29, 2309–2324.

Tseng, C.-T.K., Klimpel, G.R., 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. J. Exp. Med. 195, 43–49.

Ueberham, E., Löw, R., Ueberham, U., Schönig, K., Bujard, H., Gebhardt, R., 2003. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. Hepatology 37, 1067–1078.

Uemura, M., Swenson, E.S., Gaça, M.D.A., Giordano, F.J., Reiss, M., Wells, R.G., 2005. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. Mol. Biol. Cell 16, 4214–4224.

Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., Walker, M.M., Diez, S., Darrington, R.S., Waxman, J., Kypta, R.M., 2010. Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. Mol. Cancer 9, 55.

Vallenius, T., Vaahtomeri, K., Kovac, B., Osiceanu, A.-M., Viljanen, M., Mäkelä, T.P., 2011. An association between NUAK2 and MRIP reveals a novel mechanism for regulation of actin stress fibers. J. Cell. Sci. 124, 384–393.

Van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., Machat, G., Grubinger, M., Huber, H., Mikulits, W., 2009. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Future Oncol 5, 1169–1179.

Varshney, J., Sharma, P.K., Sharma, A., 2012. A review on an update of NS5B polymerase hepatitis C virus inhibitors. Eur Rev Med Pharmacol Sci 16, 667–671.

Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E., Boeke, J.D., 1996. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10315–10320.

Vidal, M., Legrain, P., 1999. Yeast forward and reverse "n"-hybrid systems. Nucleic Acids Res. 27, 919–929.

Wang, J.-T., Doong, S.-L., Teng, S.-C., Lee, C.-P., Tsai, C.-H., Chen, M.-R., 2009. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase suppresses the interferon regulatory factor 3 signaling pathway. J. Virol. 83, 1856–1869.

Wang, X.Q., Zhang, W., Lui, E.L.H., Zhu, Y., Lu, P., Yu, X., Sun, J., Yang, S., Poon, R.T.P., Fan, S.T., 2012. Notch1-Snail1-E-cadherin pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. International Journal of Cancer 131, E163–E172.

Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., Jacobson, I., 2012. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. Gut 61 Suppl 1, i36–46.

Wendt, M.K., Tian, M., Schiemann, W.P., 2012. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-β-induced EMT during cancer progression. Cell Tissue Res. 347, 85–101.

Wiese, M., Berr, F., Lafrenz, M., Porst, H., Oesen, U., 2000. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. Hepatology 32, 91–96.

Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.-R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., Forman-Kay, J.D., 2007. Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. Cell 130, 651–662.

Williams, R., 2006. Global challenges in liver disease. Hepatology 44, 521–526.

Wilson, G.K., Brimacombe, C.L., Rowe, I.A., Reynolds, G.M., Fletcher, N.F., Stamataki, Z., Bhogal, R.H., Simões, M.L., Ashcroft, M., Afford, S.C., Mitry, R.R., Dhawan, A., Mee, C.J., Hübscher, S.G., Balfe, P., McKeating, J.A., 2012. A dual role for hypoxia inducible factor-1α in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. J Hepatol. 56, 803–809.

Wrighton, K.H., Lin, X., Feng, X.-H., 2009. Phospho-control of TGF-β superfamily signaling. Cell Research 19, 8–20.

Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., Shi, Y., 2002. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. Cell 111, 357–367.

Wu, W., Shao, S., Zhao, L., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S., Qi, Z., 2007. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. Intervirology 50, 341–346.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, 701–704.

Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R., 2009. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res. 19, 156–172.

Yakicier, M.C., Irmak, M.B., Romano, A., Kew, M., Ozturk, M., 1999. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. Oncogene 18, 4879–4883.

Yan, X., Chen, Y.-G., 2011. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-β signalling. Biochem. J. 434, 1–10.

Yang, L., 2010. TGFbeta and cancer metastasis: an inflammation link. Cancer Metastasis Rev. 29, 263–271.

Yang, L., Pang, Y., Moses, H.L., 2010. TGF-β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. Trends in Immunology 31, 220–227.

Yang, M.-H., Chen, C.-L., Chau, G.-Y., Chiou, S.-H., Su, C.-W., Chou, T.-Y., Peng, W.-L., Wu, J.-C., 2009. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. Hepatology 50, 1464–1474.

Yao, L., Li, F.-J., Tang, Z.-Q., Gao, S., Wu, Q.-Q., 2012. Smad4 expression in hepatocellular carcinoma differs by hepatitis status. Asian Pac. J. Cancer Prev. 13, 1297–1303.

Yook, J.I., Li, X.-Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., Fearon, E.R., Weiss, S.J., 2006. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. Nat. Cell Biol. 8, 1398–1406.

Yoshida, K., Matsuzaki, K., 2012. Differential regulation of TGF-β/Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. Front. Physio. 3, 53.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., Mori, T., 2010. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. J. Biochem. 147, 781–792.

Yu, J., Pan, L., Qin, X., Chen, H., Xu, Y., Chen, Y., Tang, H., 2010. MTMR4 Attenuates Transforming Growth Factor (TGF) Signaling by Dephosphorylating R-Smads in Endosomes. Journal of Biological Chemistry 285, 8454–8462.

Yun, J., Song, S.-H., Park, J., Kim, H.-P., Yoon, Y.-K., Lee, K.-H., Han, S.-W., Oh, D.-Y., Im, S.-A., Bang, Y.-J., Kim, T.-Y., 2012. Gene silencing of EREG mediated by DNA methylation and histone modification in human gastric cancers. Lab. Invest. 92, 1033–1044.

Yuzugullu, H., Benhaj, K., Ozturk, N., Senturk, S., Celik, E., Toylu, A., Tasdemir, N., Yilmaz, M., Erdal, E., Akcali, K.C., Atabey, N., Ozturk, M., 2009. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. Mol. Cancer 8, 90.

Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., Kalluri, R., 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. J. Biol. Chem. 282, 23337–23347.

Zhai, B., Yan, H.-X., Liu, S.-Q., Chen, L., Wu, M.-C., Wang, H.-Y., 2008. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. World J. Gastroenterol. 14, 5665–5673.

Zhang, H., Cohen, S.N., 2004. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. Genes Dev. 18, 3028–3040.

Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B.E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K.-A., Porter, J.A., Lu, C.X., Ten Dijke, P., 2012a. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-β type I receptor. Nat. Cell Biol. 14, 717–726.

Zhang, P., Cai, Y., Soofi, A., Dressler, G.R., 2012b. Activation of Wnt11 by Transforming Growth Factor-β Drives Mesenchymal Gene Expression through Non-canonical Wnt Protein Signaling in Renal Epithelial Cells. J Biol Chem 287, 21290–21302.

Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.-H., Meng, A., Chen, Y.-G., 2007. Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor β Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. Mol. Cell. Biol. 27, 4488–4499.

Zhang, Y.E., 2009. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. Cell Research 19, 128–139.

ANNEXES

- Annexe 1 : liste de gènes régulés par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 et dans les Huh9.13-cured (FC)

- Annexe 2 : Termes GO associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured

- Annexe 3 : Arbre GO associant les 76 termes GO significativement associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ

- Annexe 4 : article soumis à Journal of Hepatology « Direct targeting of SMURF2 by HCV enhances TGFβ signaling and promotes Epithelial-to-Mesenchymal transition »

Annexe 1 : liste des gènes régulés par leTGFβ dans les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured (FC)

official gene symbol	gene name	Huh9.13-cured	Huh9.13
ABCA5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	1,9	**2,7**
ABHD6	abhydrolase domain containing 6	**2,4**	1,8
ACOX3	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	**2,1**	**2,8**
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	-2,0	**-2,3**
ADAMTS6	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 6	**2,8**	**2,3**
AGBL2	ATP/GTP binding protein-like 2	**2,9**	**2,3**
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	**-2,0**	-1,9
AHR	aryl hydrocarbon receptor	**-2,7**	**-2,4**
AK3	adenylate kinase 3	**2,1**	1,5
AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	**2,1**	2,0
ANGPTL2	angiopoietin-like 2	1,8	**2,0**
AREG	amphiregulin; amphiregulin B	**-2,1**	**-2,4**
BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	**2,9**	**3,0**
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	**3,0**	**2,6**
BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	**3,9**	**3,1**
BMF	Bcl2 modifying factor	**3,6**	**2,6**
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	**2,2**	**2,1**
C10orf26	chromosome 10 open reading frame 26	**2,1**	**2,0**
C11orf17///NUAK2	chromosome 11 open reading frame 17///NUAK family, SNF1-like kinase, 2	1,0	**2,1**
C12orf49	chromosome 12 open reading frame 49	**3,1**	**2,2**
C17orf44	chromosome 17 open reading frame 44	**2,1**	1,6
C1orf106	chromosome 1 open reading frame 106	**3,2**	**3,0**
C1orf161	chromosome 1 open reading frame 161	**3,1**	1,7
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	1,7	**2,5**
C9orf95	chromosome 9 open reading frame 95	**2,0**	1,6
CADM1	cell adhesion molecule 1	**2,1**	**2,1**
CAPS2	calcyphosine 2	**2,6**	1,8
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	**-5,2**	**-3,0**
CCNG2	cyclin G2	**2,0**	1,6
CCR6	cyclin L2; chemokine (C-C motif) receptor 6	**-4,7**	**-3,4**
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	**2,3**	1,9

CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	1,5	**2,1**
CHST15	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15	1,1	**2,2**
CLIP2	CAP-GLY domain containing linker protein 2	2,0	1,6
COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	**2,1**	1,6
CPA6///CPB1	carboxypeptidase A6///carboxypeptidase B1 (tissue)	**3,0**	1,7
CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1	1,7	**2,2**
CTGF	connective tissue growth factor	**-3,4**	-1,5
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1,6	**-2,4**
CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	**-2,0**	-2,0
CXXC5	CXXC finger 5	**2,4**	**2,1**
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	**2,0**	1,9
CYP39A1	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1	-1,5	**-3,0**
CYTIP	cytohesin 1 interacting protein	**-2,5**	-1,2
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	**4,9**	**4,5**
Dhrs3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	**2,2**	**2,1**
DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	**7,7**	**3,1**
DLX2	distal-less homeobox 2	**3,6**	1,3
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	**3,9**	**4,1**
DOCK8	dedicator of cytokinesis 8	**2,1**	1,8
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	**2,8**	1,9
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	**-2,9**	**-2,4**
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	**-6,3**	**-3,0**
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	**-4,2**	**-2,9**
ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	1,8	2,0
ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	**3,8**	**2,6**
ENO3	enolase 3 (beta, muscle)	**2,1**	1,9
Epas1	endothelial PAS domain protein 1	1,9	2,0
EPPK1	epiplakin 1	**3,3**	**2,6**
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	**2,1**	1,8
EREG	epiregulin	-1,1	**-3,9**
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	**2,1**	**2,2**
ETV1	ets variant 1	**-2,0**	-1,7
F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	**2,0**	**2,4**
FAM113B	family with sequence similarity 113, member B	**2,1**	**2,0**
FAM177A1	family with sequence similarity 177, member A1	**2,0**	1,9

FAM47E///STBD1	family with sequence similarity 47, member E///starch binding domain 1	2,0	**2,1**
FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	**2,4**	1,7
FHOD3	formin homology 2 domain containing 3	2,0	**2,4**
FLJ35776	hypothetical LOC649446	**2,0**	1,8
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	**2,0**	**2,1**
FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	-1,7	**-2,1**
FOXF2	forkhead box F2	**2,1**	1,4
FRMD3	FERM domain containing 3	**-4,0**	**-3,5**
FST	follistatin	**2,1**	**2,0**
FZD2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	**2,1**	**2,1**
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	**3,1**	**3,1**
GALNT5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)	-1,3	**-2,0**
GPC6	glypican 6	1,8	**2,1**
GPR133	G protein-coupled receptor 133	**2,4**	1,9
GPR157	G protein-coupled receptor 157	**3,8**	**3,5**
GRAMD1A	GRAM domain containing 1A	**2,3**	1,8
H2AFY2	H2A histone family, member Y2	**3,9**	**2,6**
HEPACAM2	HEPACAM family member 2	**-2,5**	-1,8
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	1,9	**2,1**
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	**6,4**	**4,8**
HLF	hepatic leukemia factor	**-2,7**	**-3,0**
HTRA3	HtrA serine peptidase 3	**3,5**	1,8
ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	**-2,7**	**-2,8**
ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	**-2,4**	**-3,0**
IER3	immediate early response 3	1,5	**2,1**
IER5L	immediate early response 5-like	2,0	1,7
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	-1,4	**-3,0**
IL9	interleukin 9	**2,2**	1,6
INHBE	inhibin, beta E	**9,7**	**5,6**
ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	1,9	**2,3**
JUN	jun oncogene	**2,4**	**2,3**
JUNB	jun B proto-oncogene	**16,1**	**8,2**
KLF10	Kruppel-like factor 10	**2,4**	1,9
KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	**2,6**	**2,7**
LARP6	La ribonucleoprotein domain family, member 6	**2,9**	**2,5**

LEFTY1	left-right determination factor 1	**40,4**	**12,7**
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	**4,0**	**3,8**
LIPG	lipase, endothelial	**2,1**	**2,5**
LOC100132999	hypothetical protein LOC100132999	**2,2**	1,6
LOC100506781	hypothetical protein LOC100506781	**2,3**	**2,4**
LOC157273	hypothetical protein LOC157273	**2,2**	1,6
LOC283050	hypothetical LOC283050	**2,5**	1,7
LOC283278	hypothetical protein LOC283278	2,0	1,6
LOC283392	hypothetical LOC283392	**2,2**	1,7
LOC389332	hypothetical LOC389332	**2,1**	**2,0**
LOC727820	hypothetical protein LOC727820	**2,5**	**2,4**
LOC728431	hypothetical LOC728431	1,6	2,0
LOC728855///FAM91A2///FLJ39739 ///LOC100286793///LOC728875	hypothetical LOC728855//family with sequence similarity 91, member A2//hypothetical FLJ39739//hypothetical LOC100286793//hypothetical LOC728875	**2,3**	1,9
LOC730101	hypothetical LOC730101	-2,0	-2,0
LOH3CR2A	loss of heterozygosity, 3, chromosomal region 2, gene A	1,7	**2,1**
LOXL4	lysyl oxidase-like 4	**3,2**	**2,4**
LPAR6	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	**2,7**	**2,3**
LRP12	low density lipoprotein-related protein 12	**-2,0**	-1,5
LRRN1	leucine rich repeat neuronal 1	**2,2**	1,6
MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)	**3,6**	**3,8**
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	**-2,2**	-1,2
MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	**2,2**	**2,2**
MEX3B	mex-3 homolog B (C. elegans)	**2,1**	1,7
MICAL2	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2	**2,9**	**2,3**
MLLT11	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11	**2,5**	1,8
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	**-5,7**	**-3,1**
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	-1,7	-2,0
NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)	**2,0**	1,9
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	2,0	**3,1**
NCKAP5	Nck-associated protein 5	**-2,2**	-2,0
NCRNA00085	non-protein coding RNA 85	**2,1**	1,7
NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	-1,9	**-2,2**
NPNT	nephronectin	**3,2**	**3,5**
NPW	neuropeptide W	**2,7**	2,0

NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	-1,9	-2,0
NR2F6	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	**2,2**	1,9
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	**10,7**	**6,6**
NRP2	neuropilin 2	1,9	**2,6**
NTAN1	N-terminal asparagine amidase	**3,1**	1,8
NUAK1	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	1,8	**2,9**
NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	**4,0**	**2,7**
NXPH2	neurexophilin 2	-1,5	-2,0
OBFC2A	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A	**-2,1**	-1,8
OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1	**2,2**	**2,2**
OR7E14P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 14 pseudogene	**2,3**	1,9
OSBPL6	oxysterol binding protein-like 6	**2,4**	2,0
OSTBETA	organic solute transporter beta	**-3,9**	**-2,6**
PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	**-2,3**	**-2,2**
PALMD	palmdelphin	**2,2**	1,9
PDE9A	phosphodiesterase 9A	**2,4**	2,0
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	**2,1**	**2,0**
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	**2,2**	1,7
PGM2L1	phosphoglucomutase 2-like 1	**2,6**	**2,7**
PLD6	phospholipase D family, member 6	**-2,2**	**-2,2**
PPM1K	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	**-2,1**	-1,8
PPP1R13L	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13 like	1,7	**2,6**
PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	**4,6**	**4,1**
PRRG4	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	**2,2**	**2,2**
PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	**2,3**	1,8
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	-1,5	**-2,0**
RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein	**2,4**	1,8
RAP1GAP2	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 4	2,0	**2,5**
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	-2,0	**-2,0**
RASSF9	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 9	**-2,1**	**-2,8**
RCHY1	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1	**-2,2**	-1,6
RELL1	RELT-like 1	**2,0**	**2,0**
RFK	riboflavin kinase	**2,4**	2,0
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	**-2,6**	-2,0
RND1	Rho family GTPase 1	**4,8**	**3,9**

SAMD11	sterile alpha motif domain containing 11	**2,0**	1,7
SDC4	syndecan 4	2,0	**2,2**
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	**3,3**	**2,9**
SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	**2,9**	**2,0**
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	**2,8**	1,9
SIK1	salt-inducible kinase 1	1,9	2,0
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,4	**2,2**
SKI	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)	**3,7**	**2,8**
SKIL	SKI-like oncogene	**2,9**	**2,7**
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7); similar to solute carrier family 16, member 6	**3,0**	1,5
SLC26A3	solute carrier family 26, member 3	**-2,2**	**-2,0**
SLC2A12	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12	**2,0**	1,6
SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-1,4	-2,0
SLCO1B3	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	**-2,1**	-1,7
SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	**2,1**	**2,2**
SMAD3	SMAD family member 3	1,9	**2,5**
SMAD7	SMAD family member 7	**3,0**	**2,2**
SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	**2,2**	1,8
SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	1,7	**2,0**
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	**-2,2**	-2,0
SPTLC3	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3	**-2,7**	**-2,0**
ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	**2,1**	1,3
SUN3	Sad1 and UNC84 domain containing 1	**6,7**	**2,3**
TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	**-4,0**	**-3,2**
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	1,8	**2,3**
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1	1,7	**2,3**
TMC7	transmembrane channel-like 7	**3,3**	**2,8**
TMEM49	transmembrane protein 49	1,8	**2,0**
TMEM87B	transmembrane protein 87B	**2,1**	1,9
TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	**-2,6**	-1,7
TNS1	tensin 1	**2,7**	**2,3**
TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	2,0	2,0
UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	**2,5**	**3,6**
ULK1	unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	**2,4**	**2,3**

UPP1	uridine phosphorylase 1	2,0	1,7
VIM	vimentin	1,5	2,0
ZFP36L1	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	1,9	**2,0**
ZNF597	zinc finger protein 597	**3,4**	**3,6**
ZXDA///ZXDB	zinc finger, X-linked, duplicated A///zinc finger, X-linked, duplicated B	**2,5**	**2,2**

Annexe 2 : Termes GO associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ dans les cellules Huh9.13 et Huh9.13-cured

Termes GO associés à la liste des gènes positivement et négativement régulés par le TGFβ dans les Huh9.13-cured

Term	Count	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0050793~regulation of developmental process	21	663	13187	0,0049242095
GO:0050794~regulation of cellular process	83	6268	13187	0,0147587759
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	8	101	13187	0,0211927368
GO:0050789~regulation of biological process	84	6548	13187	0,0244694100
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	22	925	13187	0,0270644441
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	13	357	13187	0,0313139218
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	13	351	13187	0,0320354089
GO:0065007~biological regulation	86	6919	13187	0,0326348203
GO:0009605~response to external stimulus	21	894	13187	0,0337997141
GO:0010629~negative regulation of gene expression	15	497	13187	0,0364918193
GO:0016481~negative regulation of transcription	14	453	13187	0,0420542737
GO:0048519~negative regulation of biological process	32	1787	13187	0,0496109166

Count = nombre de gènes associés au terme GO parmi la liste soumise

Pop hits = nombre total de gènes associés au terme GO

Pop total = nombre total de gènes dans la liste utilisé comme référence

Termes GO associés à la liste des gènes positivement régulés par le TGFβ dans les Huh9.13-cured

Term	Count	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0050793~regulation of developmental process	18	663	13187	0.003504403
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	8	101	13187	0.0040282008
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	18	925	13187	0.048068439

Termes GO associés à la liste des gènes positivement et négativement régulés par le TGFβ dans les Huh9.13

Term	Count	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	10	101	13187	0,00050717
GO:0048519~negative regulation of biological process	36	1787	13187	0,00291168
GO:0045595~regulation of cell differentiation	16	481	13187	0,00390487
GO:0009653~anatomical structure morphogenesis	28	1176	13187	0,00408937
GO:0050793~regulation of developmental process	19	663	13187	0,00414599
GO:0050794~regulation of cellular process	80	6268	13187	0,00447019
GO:0032502~developmental process	49	3066	13187	0,00454749
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	20	717	13187	0,00466745
GO:0007275~multicellular organismal development	46	2785	13187	0,00472266
GO:0001944~vasculature development	12	252	13187	0,00475961
GO:0010629~negative regulation of gene expression	16	497	13187	0,00487268
GO:0016481~negative regulation of transcription	15	453	13187	0,00509397
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	17	566	13187	0,00511586
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	11	212	13187	0,00513256
GO:0009605~response to external stimulus	22	894	13187	0,00527386
GO:0048523~negative regulation of cellular process	33	1637	13187	0,00528176
GO:0009892~negative regulation of metabolic process	20	768	13187	0,00528557
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	13	339	13187	0,00545719
GO:0031324~negative regulation of cellular metabolic process	19	709	13187	0,00545904
GO:0001568~blood vessel development	12	246	13187	0,00569942
GO:0050789~regulation of biological process	81	6548	13187	0,00812416
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	16	540	13187	0,00825113
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	10	213	13187	0,00941410
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	16	554	13187	0,00956639
GO:0048731~system development	38	2271	13187	0,01058912

GO:0048856~anatomical structure development	40	2465	13187	0,01139074
GO:0007179~transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	60	13187	0,01156876
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	15	505	13187	0,01166386
GO:0006275~regulation of DNA replication	6	61	13187	0,01167626
GO:0042127~regulation of cell proliferation	19	783	13187	0,01181263
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	21	925	13187	0,01204603
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	15	512	13187	0,01204774
GO:0065007~biological regulation	83	6919	13187	0,01286352
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	18	722	13187	0,01309908
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	14	472	13187	0,01531514
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	14	472	13187	0,01531514
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	5	38	13187	0,01534375
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	12	351	13187	0,01555681
GO:0042221~response to chemical stimulus	25	1263	13187	0,01572644
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	12	357	13187	0,01611001
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	16	613	13187	0,01694175
GO:0048513~organ development	30	1694	13187	0,01827234
GO:0051093~negative regulation of developmental process	10	256	13187	0,01995292
GO:0051052~regulation of DNA metabolic process	7	113	13187	0,02044809
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	19	843	13187	0,02074479
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	16	633	13187	0,02099432
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	10	262	13187	0,02104784
GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction	27	1471	13187	0,02114517

Termes GO associés à la liste des gènes positivement régulés par le TGFβ dans les Huh9,13

Term	Count	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	10	101	13187	0,000022029
GO:0050793~regulation of developmental process	17	663	13187	0,002918831
GO:0009653~anatomical structure morphogenesis	22	1176	13187	0,003476617
GO:0048519~negative regulation of biological process	28	1787	13187	0,004018045
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	19	925	13187	0,004436883
GO:0045595~regulation of cell differentiation	14	481	13187	0,005255495
GO:0001568~blood vessel development	10	246	13187	0,005532926
GO:0001944~vasculature development	10	252	13187	0,005848463
GO:0007179~transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	60	13187	0,006203065
GO:0007275~multicellular organismal development	35	2785	13187	0,007781332
GO:0048523~negative regulation of cellular process	25	1637	13187	0,007973614
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	9	212	13187	0,008080407
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	5	38	13187	0,010533724
GO:0031324~negative regulation of cellular metabolic process	15	709	13187	0,015671708
GO:0032502~developmental process	36	3066	13187	0,015678816
GO:0051270~regulation of cell motion	8	193	13187	0,020608353
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	13	566	13187	0,020833940
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	10	339	13187	0,024501188
GO:0009892~negative regulation of metabolic process	15	768	13187	0,026144375
GO:0032879~regulation of localization	13	607	13187	0,026608381
GO:0048856~anatomical structure development	30	2465	13187	0,026790144
GO:0050794~regulation of cellular process	57	6268	13187	0,026838106
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	10	351	13187	0,027045101
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	8	213	13187	0,027148974
GO:0051094~positive regulation of developmental process	9	277	13187	0,027523707
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	10	357	13187	0,027913967
GO:0016481~negative regulation of transcription	11	453	13187	0,031169577

GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	12	540	13187	0,031224874
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	14	717	13187	0,031977000
GO:0048731~system development	28	2271	13187	0,033420816
GO:0030334~regulation of cell migration	7	169	13187	0,033428557
GO:0050789~regulation of biological process	58	6548	13187	0,033987828
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	11	472	13187	0,034142923
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	11	472	13187	0,034142923
GO:0032388~positive regulation of intracellular transport	4	30	13187	0,034643463
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	12	554	13187	0,034881079
GO:0051222~positive regulation of protein transport	5	66	13187	0,034906663
GO:0065007~biological regulation	60	6919	13187	0,038934061
GO:0010629~negative regulation of gene expression	11	497	13187	0,045028118
GO:0051093~negative regulation of developmental process	8	256	13187	0,045958091
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	8	262	13187	0,046392430
GO:0040012~regulation of locomotion	7	192	13187	0,047368299
GO:0010717~regulation of epithelial to mesenchymal transition	3	9	13187	0,048041538

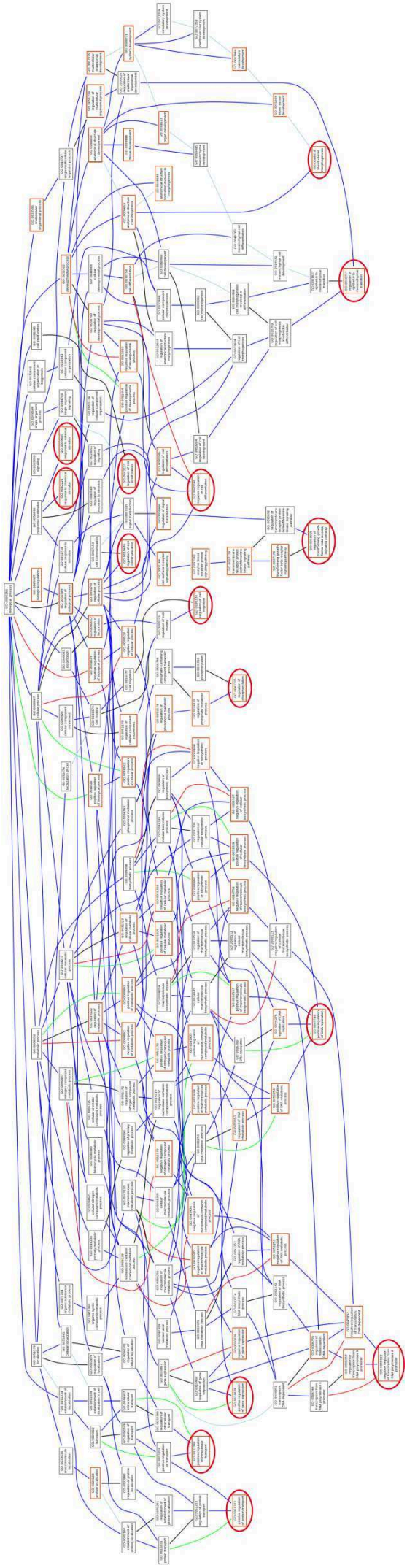
Annexe 3 : Arbre GO associant les 75 termes GO significativement associés aux listes de gènes régulés par le TGFβ

Arbre de GO termes reconstruit avec l'outil de visualisation de la base de données en ligne Amigo v1.8 à partir des 75 termes significativement associés aux gènes régulés par TGFβ (indiqué dans la case orange). Les termes GO encerclés en rouge correspondent aux termes GO situé à l'extrémité des branches.

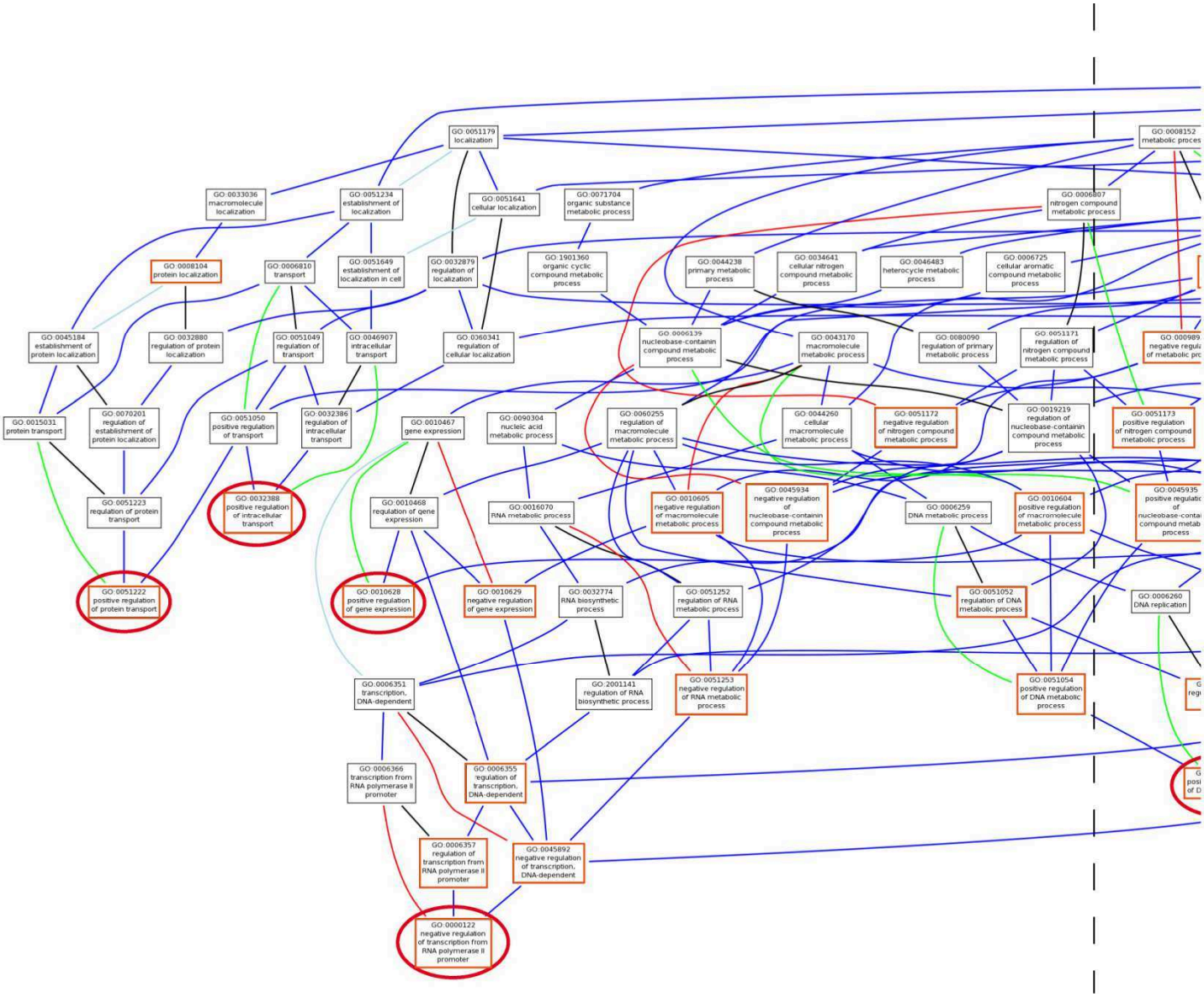
A : Visualisation de l'ensemble de l'arbre GO

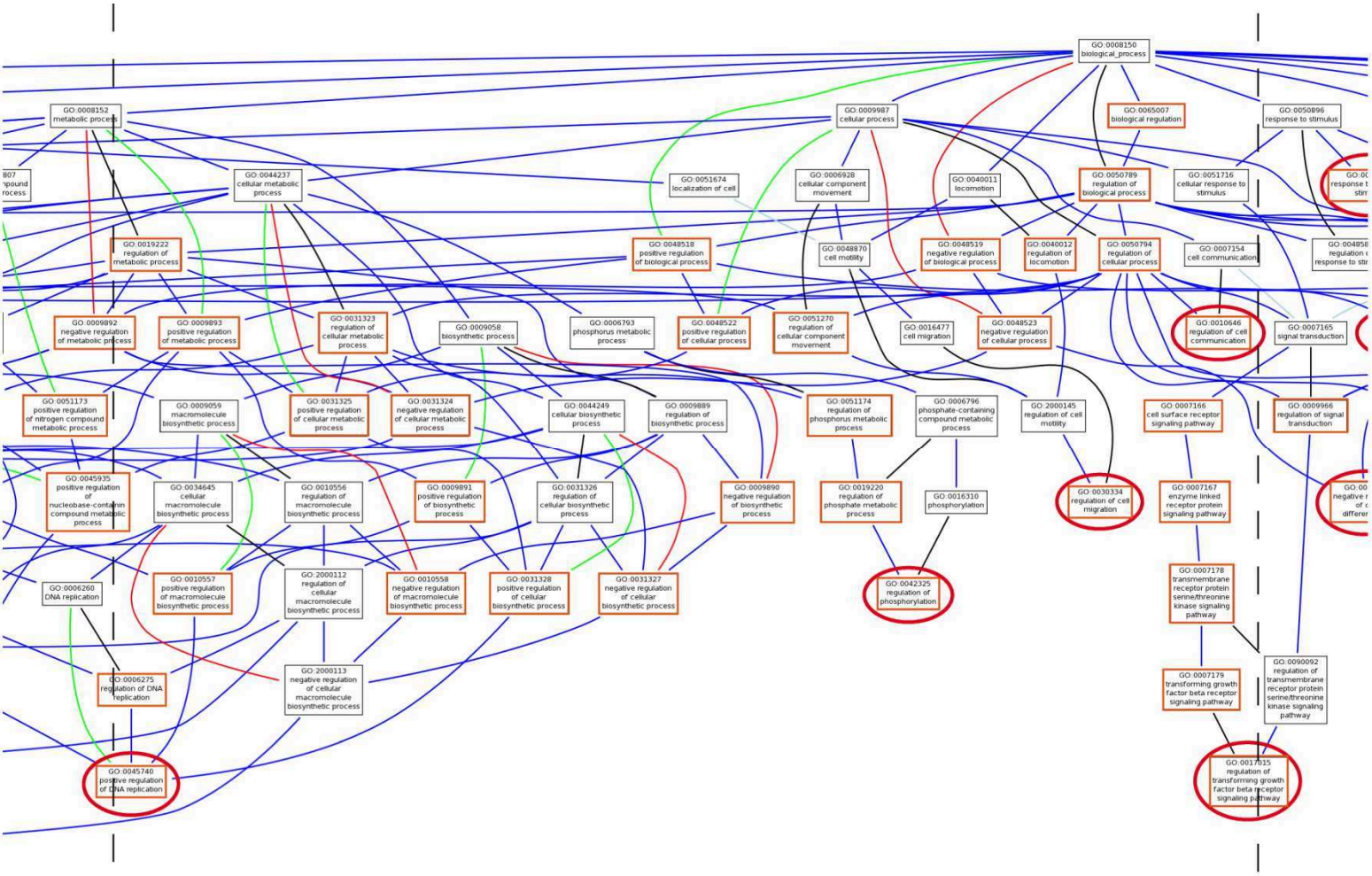
B : Grossissement de l'arbre GO, les pointillés indiquent les zones de chevauchement.

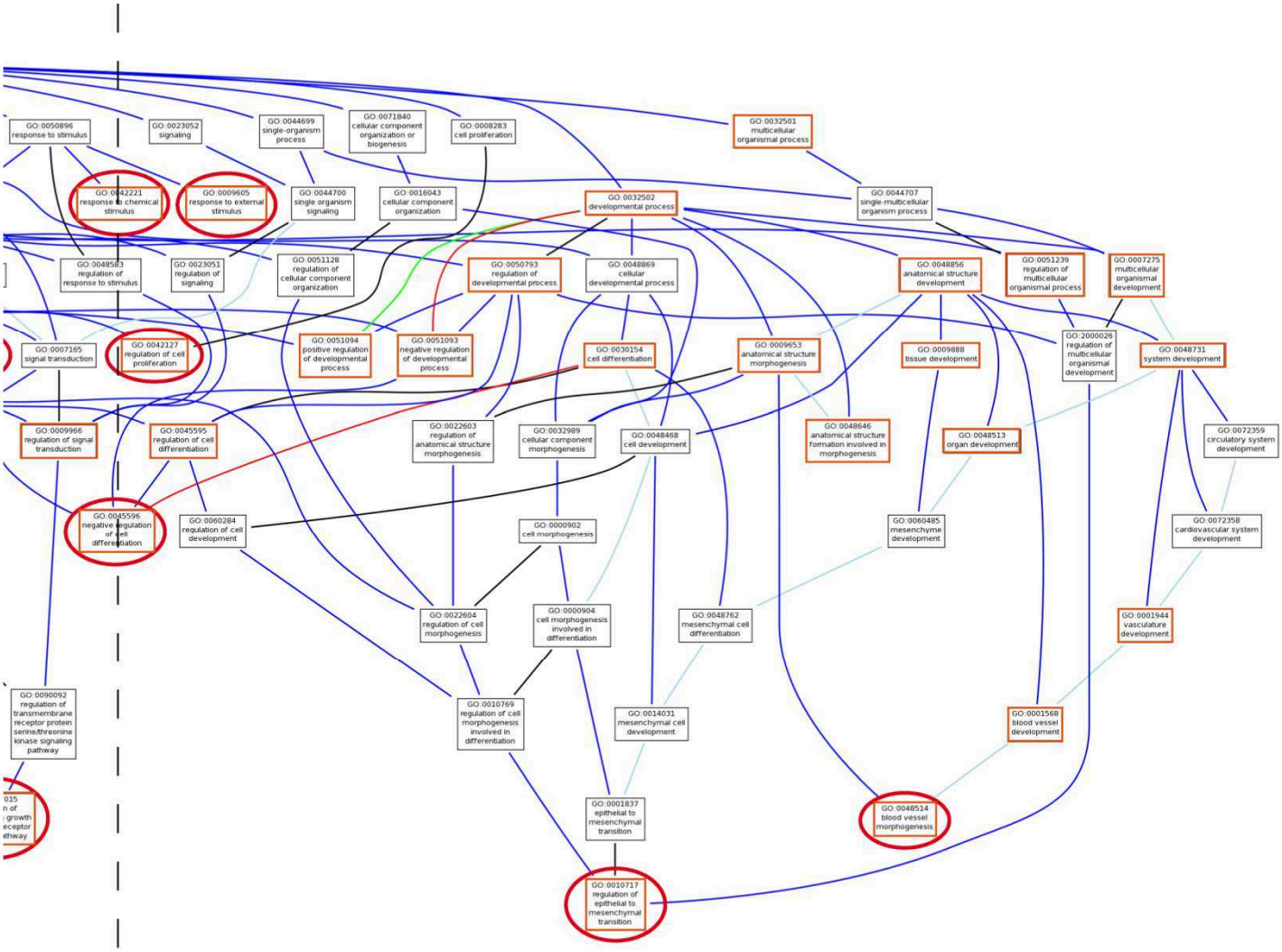
A



B


GO:0051179 localization
GO:0033036 macromolecule localization
GO:0051234 establishment of localization
GO:0051641 cellular localization
GO:0071704 organic substance metabolic process
GO:0008104 protein localization
GO:0006810 transport
GO:0051649 establishment of localization in cell
GO:0032879 regulation of localization
GO:1901360 organic cyclic compound metabolic process
GO:0044238 primary metabolic process
GO:0034641 cellular nitrogen compound metabolic process
GO:0046483 heterocycle metabolic process
GO:0006725 cellular aromatic compound metabolic process
GO:0045184 establishment of protein localization
GO:0032880 regulation of protein localization
GO:0051049 regulation of transport
GO:0046907 intracellular transport
GO:0060341 regulation of cellular localization
GO:0006139 nucleobase-containin compound metabolic process
GO:0043170 macromolecule metabolic process
GO:0080090 regulation of primary metabolic process
GO:0051171 regulation of nitrogen compound metabolic process
GO:0015031 protein transport
GO:0070201 regulation of establishment of protein localization
GO:0051050 positive regulation of transport
GO:0032386 regulation of intracellular transport
GO:0010467 gene expression
GO:0090304 nucleic acid metabolic process
GO:0060255 regulation of macromolecule metabolic process
GO:0044260 cellular macromolecule metabolic process
GO:0051172 negative regulation of nitrogen compound metabolic process
GO:0019219 regulation of nucleobase-containin compound metabolic process
GO:0051173 positive regulation of nitrogen compound metabolic process
GO:0051223 regulation of protein transport
GO:0032388 positive regulation of intracellular transport
GO:0010468 regulation of gene expression
GO:0016070 RNA metabolic process
GO:0010605 negative regulation of macromolecule metabolic process
GO:0045934 negative regulation of nucleobase-containin compound metabolic process
GO:0006259 DNA metabolic process
GO:0010604 positive regulation of macromolecule metabolic process
GO:0051222 positive regulation of protein transport
GO:0010628 positive regulation of gene expression
GO:0010629 negative regulation of gene expression
GO:0032774 RNA biosynthetic process
GO:0051252 regulation of RNA metabolic process
GO:0051052 regulation of DNA metabolic process
GO:0006260 DNA replication
GO:0006351 transcription, DNA-dependent
GO:2001141 regulation of RNA biosynthetic process
GO:0051253 negative regulation of RNA metabolic process
GO:0051054 positive regulation of DNA metabolic process
GO:0006366 transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0006355 regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0006357 regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0045892 negative regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0000122 negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter


GO:0008150
biological_process
GO:0008152
metabolic process
GO:0009987
cellular process
GO:0065007
biological regulation
GO:0050896
response to stimulus
GO:0044237
cellular metabolic process
GO:0051674
localization of cell
GO:0006928
cellular component movement
GO:0040011
locomotion
GO:0050789
regulation of biological process
GO:0051716
cellular response to stimulus
GO:0019222
regulation of metabolic process
GO:0048518
positive regulation of biological process
GO:0048870
cell motility
GO:0048519
negative regulation of biological process
GO:0040012
regulation of locomotion
GO:0050794
regulation of cellular process
GO:0007154
cell communication
GO:0009892
negative regulation of metabolic process
GO:0009893
positive regulation of metabolic process
GO:0031323
regulation of cellular metabolic process
GO:0009058
biosynthetic process
GO:0006793
phosphorus metabolic process
GO:0048522
positive regulation of cellular process
GO:0051270
regulation of cellular component movement
GO:0016477
cell migration
GO:0048523
negative regulation of cellular process
GO:0010646
regulation of cell communication
GO:0007165
signal transduction
GO:0051173
positive regulation of nitrogen compound metabolic process
GO:0009059
macromolecule biosynthetic process
GO:0031325
positive regulation of cellular metabolic process
GO:0031324
negative regulation of cellular metabolic process
GO:0044249
cellular biosynthetic process
GO:0009889
regulation of biosynthetic process
GO:0051174
regulation of phosphorus metabolic process
GO:0006796
phosphate-containing compound metabolic process
GO:2000145
regulation of cell motility
GO:0007166
cell surface receptor signaling pathway
GO:0009966
regulation of signal transduction
GO:0045935
positive regulation of nucleobase-containin compound metabolic process
GO:0034645
cellular macromolecule biosynthetic process
GO:0010556
regulation of macromolecule biosynthetic process
GO:0009891
positive regulation of biosynthetic process
GO:0031326
regulation of cellular biosynthetic process
GO:0009890
negative regulation of biosynthetic process
GO:0019220
regulation of phosphate metabolic process
GO:0016310
phosphorylation
GO:0030334
regulation of cell migration
GO:0007167
enzyme linked receptor protein signaling pathway
GO:0006260
DNA replication
GO:0010557
positive regulation of macromolecule biosynthetic process
GO:2000112
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process
GO:0010558
negative regulation of macromolecule biosynthetic process
GO:0031328
positive regulation of cellular biosynthetic process
GO:0031327
negative regulation of cellular biosynthetic process
GO:0042325
regulation of phosphorylation
GO:0007178
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway
GO:0006275
regulation of DNA replication
GO:2000113
negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process
GO:0090092
regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway
GO:0007179
transforming growth factor beta receptor signaling pathway
GO:0045740
positive regulation of DNA replication
GO:0017015
regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway


GO:0050896 response to stimulus
GO:0023052 signaling
GO:0044699 single-organism process
GO:0071840 cellular component organization or biogenesis
GO:0008283 cell proliferation
GO:0032501 multicellular organismal process
GO:0042221 response to chemical stimulus
GO:0009605 response to external stimulus
GO:0044700 single organism signaling
GO:0016043 cellular component organization
GO:0032502 developmental process
GO:0044707 single-multicellular organism process
GO:0048583 regulation of response to stimulus
GO:0023051 regulation of signaling
GO:0051128 regulation of cellular component organization
GO:0050793 regulation of developmental process
GO:0048869 cellular developmental process
GO:0048856 anatomical structure development
GO:0051239 regulation of multicellular organismal process
GO:0007275 multicellular organismal development
GO:0007165 signal transduction
GO:0042127 regulation of cell proliferation
GO:0051094 positive regulation of developmental process
GO:0051093 negative regulation of developmental process
GO:0030154 cell differentiation
GO:0009653 anatomical structure morphogenesis
GO:0009888 tissue development
GO:2000026 regulation of multicellular organismal development
GO:0048731 system development
GO:0009966 regulation of signal transduction
GO:0045595 regulation of cell differentiation
GO:0022603 regulation of anatomical structure morphogenesis
GO:0032989 cellular component morphogenesis
GO:0048468 cell development
GO:0048646 anatomical structure formation involved in morphogenesis
GO:0048513 organ development
GO:0072359 circulatory system development
GO:0045596 negative regulation of cell differentiation
GO:0060284 regulation of cell development
GO:0000902 cell morphogenesis
GO:0060485 mesenchyme development
GO:0072358 cardiovascular system development
GO:0022604 regulation of cell morphogenesis
GO:0000904 cell morphogenesis involved in differentiation
GO:0048762 mesenchymal cell differentiation
GO:0001944 vasculature development
GO:0090092 regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway
GO:0010769 regulation of cell morphogenesis involved in differentiation
GO:0014031 mesenchymal cell development
GO:0001568 blood vessel development
GO:0001837 epithelial to mesenchymal transition
GO:0048514 blood vessel morphogenesis
GO:0010717 regulation of epithelial to mesenchymal transition

Annexe 4 : article soumis à Journal of Hepatology « direct targeting of Smurf2 by HCV enhances TGFβ signaling and promotes Epithelial-to-mesenchymal transition »

*Manuscript
Click here to view linked References

Direct targeting of SMURF2 by HCV enhances TGFβ signaling and promotes Epithelial-to-Mesenchymal transition

Amandine Verga-Gérard[1,2], Marine Porcherot[1,2], Laurène Meyniel-Schicklin[1,2], Patrice André[1,2,3], Vincent Lotteau[1,2,3] and Laure Perrin-Cocon[1,2*].

[1] Université de Lyon, France;

[2] INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France;

[3] Hospices Civils de Lyon, France.

[*] Corresponding author: Dr. Laure Perrin-Cocon, INSERM U851, 21 av. Tony Garnier, F-69007 Lyon, France.
Tel: +33-437282447; Fax: +33-437282341; E-mail: laure.perrin@inserm.fr

Word count: 4996
Number of figures: 4
Number of tables: 2

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; TGFβ, transforming growth factor-β; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; ECM, extracellular matrix; FC, fold change; TβR, TGFβ-receptor.

Key Words: hepatitis C virus, TGFβ signaling pathway, hepatocellular carcinoma, epithelial-to-mesenchymal transition

Conflict of interest: The authors declare they have no competing financial interest.

Financial support: This work was supported by INSERM, Institut National du Cancer (INCa), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hepatites virales (ANRS) (grant 2009-141) and Région Rhône-Alpes (SRESR 2009-cluster X), doctoral fellowship from the Ligue contre le cancer and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) to AVG.

Abstract

Background & Aims: Hepatitis C infection is a major cause of hepatocellular carcinoma (HCC). Clinical observations indicate that the virus interferes with Tranforming Growth Factor-β (TGFβ) signaling pathway which plays an important role in HCC development. Among other functions, this cytokine is a major inducer of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), promoting cell migration, tumor invasiveness and favoring tissue fibrosis. The aim of this study was to analyze the impact of Hepatitis C virus (HCV) non structural proteins on TGFβ signaling pathway.

Methods: Biochemical and cell biology approaches were used to assess the effect of the HCV subgenomic replicon and of the viral protein NS3-4A on TGFβ signaling pathway.

Results: This study shows that HCV subgenomic replicon interferes with TGFβ signaling pathway resulting in the up-regulation of EMT-related transcription factors and regulators and promoting EMT phenotype. The protein NS3-4A interacts with SMURF2 in human cells and the expression of NS3-4A alone results in enhanced TGFβ signaling. The effect of HCV subgenomic replicon and of the protein NS3-4A on TGFβ signaling is mimicked by SMURF2 silencing and is inhibited by SMURF2 over-expression.

Conclusion: SMURF2 targeting by NS3-4A appears as an essential mechanism in the regulation of TGFβ signaling pathway during HCV infection.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is characterized by a high rate of chronicity which leads to hepatic diseases like hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. HCC is the most common liver cancer and rates fifth in incidence and third in mortality worldwide [2]. HCC is a complex and heterogeneous tumor with frequent intrahepatic spread and extrahepatic metastasis, resulting in poor prognosis [3].

Transforming growth factor-β (TGFβ) plays an important role in HCC development. Increased levels of TGFβ are associated with severe HCC and have been reported in HCV-chronically infected patients [4,5]. This increased secretion due to hepatic stellate cells activation is also correlated to the development of fibrosis [6].

TGFβ pathway is an essential regulator of many cellular processes including growth control, apoptosis and cell differentiation. In advanced stages of tumor progression, TGFβ promotes oncogenesis by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induction, stimulation of angiogenesis and suppression of anti-tumoral immune responses [7]. EMT, a process in which epithelial cells lose their phenotypic characteristic and acquire mesenchymal cells features, plays an important role in HCC development [8]. Through the generation of myofibroblasts secreting high amounts of extracellular matrix (ECM) proteins, EMT is also involved in fibrogenesis [9].

TGFβ is frequently over-expressed in tumor tissues and several studies show that stabilization or enhancement of TGFβ signaling in tumor cells lead to oncogenesis and metastasis development [10,11]. In cooperation with other microenvironmental factors such as ECM components, TGFβ signaling can transform non-invasive into invasive HCC cells through the induction of a complete EMT [12,13].

Recent studies demonstrated that HCV proteins play a role in EMT induction. Variants of Core and the envelop proteins can initiate EMT by the enhancement of TGFβ signaling

[14,15]. NS5A can also trigger EMT in hepatocytes independently of TGFβ activation [16]. The analysis of the HCV interactome showed that some proteins of the TGFβ signaling pathway are specifically targeted by the virus [17], suggesting a direct role of viral proteins in the interference with the pathway. In this study, we analyzed the effect of non-structural HCV proteins on TGFβ signaling pathway activation, in order to better understand the carcinogenesis in HCV infected patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture

Unless specified, cell culture reagents were from Life technologies. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum.

The human Huh9.13 cell line expressing the HCV NS3-NS5B subgenomic replicon of con1 strain (genotype 1b), was maintained with 1 mg/mL G418. Huh9.13-cured cells were obtained from Huh9.13 after one month treatment with 500 U/mL interferon α2a. The elimination of the replicon was verified by western blot analysis of NS5A and quantitative-PCR of NS3 (sup fig.1).

Plasmid constructs

SMURF2 and SMURF2-C716A were given by P. Kavsak (Addgene plasmids 13504 and 13505) [18] and cloned in pDONR. The other ORFs were available in pDONR. SMAD3 and SMAD4 were from hORFeome v3.1. SMAD2 and SMAD7 were a kind gift of Y. Jacob. SMURF1 was purchased from Life technologies. Viral ORFs were from the ViralORFeome [19]. The mutant NS3-4A-S139A was generated by site-directed mutagenesis (B. de Chassey, Inserm U851, Lyon). The ORFs were transferred by LR reactions in expression vectors: pDEST27™ (GST fusion, Life technologies), pCI-neo-3XF (3XFlag fusion), Flingate (3XFlag fusion). Unless specified, viral ORFs were expressed in mammalian cells using the Flingate vector.

Cell transfection

Cell transfection with mammalian expression vectors was performed with JetPEI reagent (Polyplus Transfection) according to the manufacturer’s recommendations. Huh7 cells transfected with NS3-4A expression vector were compared to control cells transfected with the empty vector or expressing a control peptide (MALENLVVLNAASVAGAHG). When

needed, Huh7 cells transfected with the Flingate vector were selected with 1 mg/ml G418. Overexpression of SMURF2 was obtained by co-transfection of increasing amounts of SMURF2 or SMURF2-C716A (in pCI-neo-3XF) expression vectors.

Extinction of SMURF2 expression was obtained by transfection of 20 pM si-RNA against SMURF2 or control si-RNA (Life technologies) using Lipofectamine2000 reagent (Life technologies). The culture medium was replaced 4h later and when needed, cells were transfected with NS3-4A or control expression vectors.

Co-immunoprecipitations

HEK-293T cells were co-transfected for viral and cellular ORFs and lyzed 48h post-transfection in 20 mM Tris-HCl pH=8.0, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal and protease inhibitor cocktail (Sigma). Immunoprecipitation was performed with anti-Flag M2 magnetic beads (Sigma). After washings and elution, viral and cellular proteins were detected by western blot with HRP-conjugated anti-Flag and anti-GST antibodies (Sigma).

Smad-dependent Luciferase Reporter Assays

Cells were transfected as above with addition of 0.1 µg Cignal Smad-reporter luciferase (Qiagen). After 24h, cells were stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ (R&D Systems) for 6h, lyzed and assayed with Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Normalized results were calculated in regard to the control without stimulation.

SMAD2/3 phosphorylation kinetics

Huh7 cells transfected with NS3-4A or control expression vectors with or without SMURF2 were stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ for various time points. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-phospho-SMAD2/3 or anti-SMAD3 rabbit monoclonal antibodies (Epitomics).

Real-time quantitative-PCR (Q-PCR) analysis

Cells were stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ during 6h before RNA extraction with RNeasy kit (Qiagen).

For Q-PCR experiments, RNA samples were treated with DNase (Ambion) before RT with high-fidelity RT mix (Life technologies). PCR amplification was performed with the primers described in table 1 with SYBRgreen-mastermix (Roche) in a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems).

For PCR-array (Qiagen) experiments, DNase treatment was performed on column during RNA extraction. RT and PCR were performed with dedicated reagents according to the manufacturer's recommendations.

Phalloïdin staining

Cells were seeded on poly-D-lysine coated glass coverslips and stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ for 48h. Cells were fixed with 4% PFA, permeabilized in PBS/0.7% gelatin/0.025% saponin and stained with phalloïdin-FITC (Sigma) and Hoechst solution (Life technologies). Cells were observed using a laser-scanning confocal microscope (LSM710, Zeiss).

Bioinformatics

PCR-array analysis was performed on quadruplicates. After normalization with housekeeping genes (B2M, RPL13A, GAPDH) the modulation of gene expression by TGFβ was determined for each cell line in fold change (FC). A parametric moderated t-test was used to calculate p-values.

SMURF2 protein interaction network was extracted from the human interactome reconstructed in the VirHostNet knowledge base, together with viral targeting informations [20], and visualized using CytoScape [21]. The significance of neighborhood enrichment was calculated with an Exact Fisher test. Other statistical analyses were performed using Student's t-test.

RESULTS

HCV subgenomic replicon enhances TGFβ signaling and promotes EMT phenotype

To determine the impact of HCV subgenomic replicon on the TGFβ signaling pathway, we first analyzed the expression of two TGFβ-target genes, SMAD7 and PAI-1. SMAD7 is an inhibitory SMAD involved in the negative feedback loop of the pathway [18]. PAI-1 is a serpine playing an important role in fibrosis [22] whose expression is enhanced in HCC [23]. Upon TGFβ stimulation, we observed an increased expression of PAI-1 in Huh9.13 cells expressing HCV proteins compared to the control Huh9.13-cured cells. SMAD7 was not differentially regulated in the two cell lines (fig.1A). The impact of the replicon on the TGFβ-induced protumorigenic EMT was then analyzed by looking at the expression of 84 EMT-related genes (PCR array) upon a 6h-TGFβ stimulation in both cell lines, as illustrated by the volcano plot (fig.1B). 24 of the 84 genes were up-regulated by TGFβ in Huh9.13 cells. Among these genes, 14 are shared with the Huh9.13-cured cell line (fig.1C). The list of genes significantly ($p<0.05$) up-regulated ($FC>2$) or down-regulated ($FC<-2$) by TGFβ in Huh9.13 or Huh9.13-cured cells is presented in table 2. Only one gene, RGS2, was down-regulated in both cell lines (tab. 2). Its down-regulation is associated with EMT process and carcinogenesis [24]. Among the most differentially regulated genes (WNT11, WNT5B, NODAL), some are implicated in development and their up-regulation in adults is often associated with dedifferentiation and cancer [25]. The differential regulation of the transcription factor SNAI2 (SNAIL2 or SLUG) involved in EMT and carcinogenesis [26] is of particular interest. Its strong up-regulation in Huh9.13 cells whereas it is down-regulated in Huh9.13-cured cells suggests that it may play an important role in the control of the TGFβ response in cells expressing HCV subgenomic replicon. To complete these observations, the polymerization of actin fibers, a characteristic feature of EMT induction, was monitored after phalloïdin staining. In Huh9.13 cells, actin polymerization was strongly induced by TGFβ

compared to control cells (fig.1D and sup fig.2), confirming that cells expressing the subgenomic replicon are prompted to engage the EMT process upon TGFβ stimulation.

SMURF2 inhibits the effect of HCV subgenomic replicon on TGFβ signaling

We previously reported that NS3 interacts with SMURF2 [17], an E3-ubiquitin ligase playing a role in the negative feedback loop of the TGFβ pathway (sup. fig.3). SMURF2 induces the degradation of SMAD2 [27] and type I TGFβ-receptor (TβR-I) in collaboration with SMAD7 [18]. SMURF2 also regulates SMAD3 by mono-ubiquitination [28] and determines the endocytosis fate of TGFβ-receptor [29]. An interactome of SMURF2 and its protein neighbors was constructed to highlight its massive targeting by viral proteins (fig.2A). Indeed, 12/66 cellular neighbors of SMURF2 in the human interactome are targeted by at least one viral protein which is a highly significant targeting (p-value=2.25×10^{-4}). Among these 12 cellular proteins, 5 are targeted by at least one HCV protein (sup. fig.4A), indicating that SMURF2 neighborhood is significantly targeted by HCV proteins (p-value=0.002046).

Interestingly, the induction of PAI-1 expression by TGFβ was reduced in Huh9.13 transfected with SMURF2 (fig.2B). Using a Smad-dependent luciferase reporter gene of TGFβ signaling, SMURF2 over-expression was also shown to antagonize the enhancer effect of the subgenomic replicon (fig.2C). Silencing of SMURF2 in Huh9.13-cured cells (sup fig.4B) resulted in an increased formation of EMT-related actin stress fibers (fig.2D) and of Smad-dependent luciferase activity upon TGFβ stimulation (fig.2E), mimicking the enhancer effect of the subgenomic replicon. In addition, HCV subgenomic replicon had no impact on TGFβ signaling in the absence of SMURF2 (fig.2D-E).

The TGFβ signaling pathway is targeted by HCV proteins

To determine how the subgenomic replicon interferes with the TGFβ signaling pathway, direct interactions between HCV proteins and intracellular actors of the pathway were investigated. Yeast two-hybrid arrays indicated that NS3 could interact with four actors of the pathway:

SMAD3, SMAD7, SMURF1 and SMURF2 (sup. fig.5A and B). Studying NS3 domains involved in these interactions, we observed that SMURF2 and SMURF1 interacted with the NS3 protease domain (sup. fig.5B). The NS3-SMURF2 interaction appeared more robust as it was resistant to 3-AT (sup. fig.5C) [17]. In co-immunoprecipitation experiments in human cells, NS3 interacted with SMAD2, SMAD3, SMURF2 and weakly with SMURF1 (fig.3A). In infected cells, the protease domain of NS3 associates with NS4A, inducing changes in NS3 conformation and forming an active protease. In co-immunoprecipitation experiments, the fully active protease NS3-4A, in which the NS4A cofactor peptide is fused at the N-terminus of NS3 [30], had an interaction profile similar to that of NS3 (fig.3A).

In conclusion, the TGFβ signaling pathway is highly targeted by NS3 and NS3-4A and the interactions with SMAD3 and SMURF2 were detected by different methods.

NS3-4A enhances TGFβ signaling pathway activation

In Huh7 cells expressing NS3-4A, PAI-1 expression was increased by TGFβ whereas SMAD7 expression remained unchanged compared to TGFβ-stimulated control cells (fig.3B). An increased transcription of the Smad-luciferase reporter was also observed in NS3-4A transfected cells upon TGFβ stimulation (fig.3C). NS3 had similar but weaker impact (data not shown). The mutant NS3-4A-S139A, lacking protease activity, had the same impact than NS3-4A (fig.3C) and the treatment of cells with NS3-4A protease inhibitor did not affect the enhancer effect of NS3-4A (Sup. fig.6A), indicating that the protease activity is not involved in NS3-4A effect on TGFβ signaling. Blocking the activity of TβR-I with SB431542 totally abolished the expression of the Smad-luciferase reporter (Sup. fig.6B), showing that the NS3-4A effect depends on TβR-I activation and does not rely on Smad activation by other pathways.

TGFβ signaling depends on the phosphorylation of R-SMAD (SMAD2 and SMAD3). In control cells, the phosphorylation of R-SMAD peaked at 30 minutes post-TGFβ stimulation

(fig.3D-E). In cells expressing NS3-4A, R-SMAD phosphorylation is enhanced and stabilized until 3h post-TGFβ stimulation (fig.3D-E).

SMURF2 plays a crucial role in the NS3-4A enhancer effect on TGFβ signaling

Among the interactions identified in this work, the interaction between SMURF2 and NS3-4A is of particular interest because SMURF2 over-expression can antagonize the effect of the subgenomic replicon on TGFβ signaling. In conditions where SMURF2 expression did not interfere with the activation of TGFβ signaling in control cells, we observed that the NS3-4A enhancer effect on TGFβ signaling could be inhibited by SMURF2 in a dose dependent manner (fig.4A). The mutant SMURF2-C716A devoid of E3-ubiquitin ligase activity displayed the same effect than the wild type SMURF2 (fig.4B), indicating that the ubiquitin-ligase activity of SMURF2 was not involved. This is in agreement with preliminary observations showing that the degradation rate of TβR was not modified in cells expressing NS3-4A (sup. fig.7A-B). SMURF2 over-expression also inhibited the increase in R-SMAD phosphorylation induced by NS3-4A expression (fig.4C-E). Therefore, NS3-4A and SMURF2 have antagonistic effects on TGFβ signaling.

Silencing of SMURF2 resulted in an increased TGFβ signaling activity in control cells of similar magnitude to that induced by NS3-4A (fig.4F). In those cells, NS3-4A had no additional effect, strongly suggesting that NS3-4A enhancer effect on the TGFβ pathway is mediated by SMURF2.

Discussion

Our results show that the HCV subgenomic replicon and NS3-4A enhance TGFβ signaling and strongly suggest that NS3-4A interferes with the negative feedback loop of the pathway by directly interacting with SMURF2. NS3-4A effect is independent of its protease activity since the mutant NS3-4A-S139A has the same impact on TGFβ signaling. SMURF2 counteracts NS3-4A enhancer effect in a dose dependant manner and the ubiquitin-ligase activity of SMURF2 is not involved in this process. Silencing of SMURF2 had the same effect on TGFβ signaling than NS3-4A expression. Therefore, it can be hypothesized that NS3-4A interaction with SMURF2 could lead to a functional titration of SMURF2 resulting in an enhanced TGFβ signaling. Although NS3-4A interaction with SMAD3 could also play a role in the enhancement of TGFβ signaling, the increased and stabilized level of R-SMAD phosphorylation is more in favor of an impact of NS3-4A on the negative feedback loop. Cheng et al. previously reported the interaction of NS3 with SMAD3 and showed that NS3 inhibited the anti-proliferative effect of TGFβ [31]. This observation is consistent with our work showing that NS3-4A and the HCV subgenomic replicon favors TGFβ-protumorigenic effects. Independently of its ubiquitin-ligase activity, SMURF2 can down-regulate TGFβ signaling pathway by interfering with the subcellular localization of TβR and SMAD7 [18,29]. Our preliminary results however showed no impact of NS3-4A on the subcellular localization of these proteins. SMURF2 has also tumor suppressor functions. In mice, Smurf2 contributes to maintain genomic stability by controlling the epigenetic modifications of histones and the protein is likely to play the same role in human cancer [32]. Interestingly, HCC is the predominant tumor developed by Smurf2-/- mice. Therefore, through its interaction with SMURF2, NS3-4A may play a role in the transformation of infected liver cells.

In the late steps of carcinogenesis, the enhancement of TGFβ signaling is associated with EMT induction that plays a major role in the invasive and metastatic potential of cancer cells [8,33]. In this work, we show that TGFβ stimulation in cells expressing HCV subgenomic replicon promotes an EMT phenotype. In these cells, TGFβ stimulation induced a strong expression of the EMT transcription factor SNAI2, whereas it is down-regulated in control cells. Under TGFβ stimulation, the HCV subgenomic replicon also enhances the expression of several proteins belonging to the TGFβ-superfamily, WNT11, WNT5B and NODAL that are known to be crucial in TGFβ-induced EMT and in carcinogenesis [34–36]. The strong up-regulation of these genes by TGFβ may therefore favor EMT-induction in infected hepatocytes and could play a role in HCC development. It has been shown that HCV infection can induce EMT in hepatocytes [14,16] and several proteins seem to play a role in this induction. Primary hepatocytes of Core-transgenic mice presented an enhanced TGFβ-induced EMT, probably due to the interaction of Core with SMAD3 [15,37]. Envelop proteins can also induce EMT by a TGFβ-dependent mechanism [14]. NS5A has recently been showed to induce EMT in hepatocytes by a TGFβ-independent mechanism [16]. NS5A can also modulate TGFβ signaling by inhibiting TGFβ-induced apoptosis [38]. Our results provide another TGFβ-dependent mechanism by which NS3-4A via its interaction with SMURF2 could promote EMT induction.

TGFβ is an essential factor in the development of HCC associated to HCV. TGFβ level is higher in HCC patients infected by HCV compared to patients with other liver diseases [39]. In HCV-infected patients with cirrhosis, the amount of linker-phosphorylated SMAD3 is enhanced [23]. The induction of this phosphoisoforme by TGFβ is associated with increased PAI-1 expression and the development of HCC. HCV subgenomic replicon and NS3-4A expression in hepatoma cells enhanced PAI-1 transcription together with EMT markers upon

TGFβ stimulation, therefore reinforcing the relevance of our findings for the development of HCC.

Several HCV proteins are known to target TGFβ signaling pathway (Core, NS5A and NS3). This study provides greater insight into the role of NS3-4A and HCV subgenomic replicon in the modulation of TGFβ signaling by the direct interaction of NS3-4A with SMURF2. The analysis of SMURF2 interactome revealed an important targeting by proteins of different viruses, strongly arguing for a role of SMURF2 and its partners in the control of generic cellular processes engaged during viral infection.

Acknowledgements

We acknowledge the contribution of the PLATIM platform, the AniRA Level 3 security laboratory and genetic analysis platforms of SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8). We gratefully acknowledge the contribution of Dr Y. Jacob (Institut Pasteur, Paris, France) and Dr M.F. Bourgeade (Inserm U785, France) for helpful discussions and materials. We thank Pr. Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) for providing Huh9.13 cells, Pr D. Lamarre (University of Montréal, Canada) for providing BILN2061, Lionel Tafforeau, Philippe Mangeot, Benoit de Chassey, Thibault Chantier for providing materials and expert technical help.

References

[1] Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. Oncogene 2006;25:3834–3847.

[2] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2012;142:1264–1273.e1.

[3] Mínguez B, Lachenmayer A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. Dis Markers 2011;31:181–190.

[4] Yamazaki K, Masugi Y, Sakamoto M. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor-β signaling in hepatocarcinogenesis. Dig Dis 2011;29:284–288.

[5] Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, et al. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. J Gastroenterol Hepatol 2003;18:393–403.

[6] Gabriel A, Ziólkowski A, Radlowski P, Tomaszek K, Dziambor A. Hepatocyte steatosis in HCV patients promotes fibrosis by enhancing TGF-beta liver expression. Hepatol Res 2008;38:141–146.

[7] Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:506–520.

[8] van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Future Oncol 2009;5:1169–1179.

[9] Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 2009;139:871–890.

[10] Eichhorn PJA, Rodón L, Gonzàlez-Juncà A, Dirac A, Gili M, Martínez-Sáez E, et al. USP15 stabilizes TGF-β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-β signaling in glioblastoma. Nat Med 2012;18:429–435.

[11] Leivonen S-K, Kähäri V-M. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. Int J Cancer 2007;121:2119–2124.

[12] Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2005;129:1375–1383.

[13] Gotzmann J, Fischer ANM, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, et al. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. Oncogene 2006;25:3170–3185.

[14] Wilson GK, Brimacombe CL, Rowe IA, Reynolds GM, Fletcher NF, Stamataki Z, et al. A dual role for hypoxia inducible factor-1α in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. J Hepatol 2012;56:803–809.

[15] Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D, Zignego AL, et al. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. PLoS ONE 2009;4:e4355.

[16] Akkari L, Grégoire D, Floc'h N, Moreau M, Hernandez C, Simonin Y, et al. Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. J Hepatol 2012 doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.027

[17] de Chassey B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaugué S, et al. Hepatitis C virus infection protein network. Mol Syst Biol 2008;4:230.

[18] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Mol Cell 2000;6:1365–1375.

[19] Pellet J, Tafforeau L, Lucas-Hourani M, Navratil V, Meyniel L, Achaz G, et al. ViralORFeome: an integrated database to generate a versatile collection of viral ORFs. Nucleic Acids Res 2010;38:D371–378.

[20] Navratil V, de Chassey B, Meyniel L, Delmotte S, Gautier C, Andre P, et al. VirHostNet: a knowledge base for the management and the analysis of proteome-wide virus-host interaction networks. Nucleic Acids Res 2009;37:D661–D668.

[21] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. Genome Res 2003;13:2498–2504.

[22] Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. Br J Haematol 2012;157:291–298.

[23] Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatology 2007;46:48–57.

[24] Jiang Z, Wang Z, Xu Y, Wang B, Huang W, Cai S. Analysis of RGS2 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. Biosci Rep 2010;30:383–390.

[25] Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 Is an Essential Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis. Cancer Res 2011;71:245–254.

[26] Uysal-Onganer P, Kypta RM. Wnt11 in 2011 – the regulation and function of a non-canonical Wnt. Acta Physiologica 2012;204:52–64.

[27] Lin X, Liang M, Feng X-H. Smurf2 Is a Ubiquitin E3 Ligase Mediating Proteasome-dependent Degradation of Smad2 in Transforming Growth Factor-β Signaling. J Biol Chem 2000;275:36818 –36822.

[28] Tang L-Y, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, et al. Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. EMBO J 2011;30:4777–4789.

[29] Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover Nat Cell Biol. 2003;5:410–421.

[30] Thibeault D, Massariol M-J, Zhao S, Welchner E, Goudreau N, Gingras R, et al. Use of the fused NS4A peptide-NS3 protease domain to study the importance of the helicase domain for protease inhibitor binding to hepatitis C virus NS3-NS4A. Biochemistry 2009;48:744–753.

[31] Cheng P-L, Chang M-H, Chao C-H, Lee Y-HW. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. Oncogene 2004;23:7821–7838.

[32] Blank M, Tang Y, Yamashita M, Burkett SS, Cheng SY, Zhang YE. A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. Nat Med 2012;18:227–234.

[33] Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in the Liver. Hepatology 2009;50:2007–2013.

[34] Zhang P, Cai Y, Soofi A, Dressler GR. Activation of Wnt11 by Transforming Growth Factor-β Drives Mesenchymal Gene Expression through Non-canonical Wnt Protein Signaling in Renal Epithelial Cells. J Biol Chem 2012;287:21290–21302.

[35] Malizia AP, Lacey N, Walls D, Egan JJ, Doran PP. CUX1/Wnt signaling regulates Epithelial Mesenchymal Transition in EBV infected epithelial cells. Exp Cell Res 2009;315:1819–1831.

[36] Lawrence MG, Margaryan NV, Loessner D, Collins A, Kerr KM, Turner M, et al. Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. Prostate 2011;71:1198–1209.

[37] Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O, et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. Oncogene 2005;24:6119–6132.

[38] Choi S-H, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. J Biol Chem 2006;281:7468–7478.

[39] Divella R, Daniele A, Gadaleta C, Tufaro A, Venneri MT, Paradiso A, et al. Circulating transforming growth factor-β and epidermal growth factor receptor as related to virus infection in liver carcinogenesis. Anticancer Res 2012;32:141–145.

Tab.1. Primers for Q-PCR

	Forward	Reverse
PAI-1	5’-CCCAGCTCATCAGCCACT	5’-GAGGTCGACTTCAGTCTCCAG
SMAD7	5’-CGATGGATTTTCTCAAACCAA	5’-AGGGGCCAGATAATTCGTTC
GAPDH	5’-CACCCACTCCTCCACCTTTGAC	5’-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

Tab.2. FC induced by TGFβ in Huh9.13 and Huh9.13-cured cells in EMT PCR-array

	Huh9.13-cured	Huh9.13	Associated functions (Qiagen)
WNT11	13,4*	23,6*	Differentiation & Development, Morphogenesis, WNT signaling pathway
SNAI2	-14,1	17,2*	Genes Up-Regulated During EMT, Differentiation & Development, Transcription Factor
WNT5B	6,7*	15,6*	Genes Up-Regulated During EMT, Differentiation & Development, WNT signaling pathway
NODAL	6,8*	11,3*	Differentiation & Development, Cell Growth & Proliferation, Migration & Motility
TWIST1	11,9*	7,0	Genes Up-Regulated During EMT, Differentiation & Development, Morphogenesis, Transcription Factor
PDGFRB	2,9*	5,8*	Cell Growth & Proliferation, Migration & Motility, Receptor tyrosine kinase signaling pathway
PAI-1	3,9*	4,8*	Genes Up-Regulated During EMT, ECM & Cell Adhesion
NOTCH1	2,0*	3,9*	Differentiation & Development, NOTCH signaling pathway, Transcription Factor
PLEK2	3,1*	3,4*	Cytoskeleton
TGFB1	2,6*	3,2*	Morphogenesis, Cell Growth & Proliferation, Migration & Motility, ECM & Cell Adhesion, TGFβ signaling pathway
IGFBP4	2,9*	2,9*	Genes Up-Regulated During EMT, Cell Growth & Proliferation,
ZEB2	2,0	2,5*	Transcription Factor
CAMK2N1	2,5*	2,4*	Genes Up-Regulated During EMT
ITGA5	1,4*	2,1*	Genes Up-Regulated During EMT, ECM & Cell Adhesion, integrin mediated signaling pathway
TGFB2	1,6	2,1*	Differentiation & Development, Cell Growth & Proliferation, Migration & Motility, ECM & Cell Adhesion, TGFβ signaling pathway
AHNAK	1,4*	2,0*	Genes Up-Regulated During EMT,
BMP1	1,2	2,0*	Genes Up-Regulated During EMT, Differentiation & Development, Cell Growth & Proliferation, ECM & Cell Adhesion, BMP signaling pathway
CALD1	1,6*	2,0*	Genes Up-Regulated During EMT, Migration & Motility,
ITGAV	1,7*	2,0*	Genes Up-Regulated During EMT, ECM & Cell Adhesion, integrin mediated signaling pathway
VIM	2,2*	1,9*	Genes Up-Regulated During EMT, Migration & Motility, Cytoskeleton
RGS2	-2,7*	-2,2*	Genes Down-Regulated During EMT, G-Protein Coupled Receptor, Receptor tyrosine kinase signaling pathways

* $p<0.05$

Figure Legends

Fig.1. TGF-β induced EMT in cell expressing HCV subgenomic replicon

(A) PAI-1 and SMAD7 expression measured by Q-PCR. Mean±SE of cDNA quantity normalized by GAPDH for 10 independent experiments, * $p<0.05$ compared to control cells.

(B, C) EMT PCR-array. Cells were stimulated with TGFβ during 6h. (B) Volcano plot indicating the FC in gene expression upon TGFβ stimulation (log_2(FC)) and the statistical significance (p value). Significantly up- and down-regulated genes by TGFβ are in the upper right and left quadrant respectively. (C) Venn diagram of TGFβ up-regulated genes.

(D) Cells were stimulated with TGFβ during 48h before phalloïdin-FITC and Hoechst staining.

Fig.2. SMURF2 plays an important role in the enhancer effect of the subgenomic replicon

(A) Graphical representation of protein-protein interactions network centered on SMURF2 showing its cellular direct partners. Nodes represent cellular proteins; edges represent protein-protein interactions. Red nodes are human proteins targeted by at least one viral protein. The width of nodes is proportional to the number of viral proteins targeting the cellular protein.

(B, C) Cells were transfected with SMURF2 and stimulated with TGFβ during 6h. (B) PAI-1 expression measured by Q-PCR. (C) Smad-dependent Luciferase reporter assay. Mean±SE for 4 independent experiments.

(D) Cells were transfected with si-RNA, stimulated with TGFβ during 48h before phalloïdin-FITC and Hoechst staining.

(E) Cells were transfected with si-RNA and Smad luciferase-reporter, stimulated with TGFβ during 6h before luminescence measurement. Mean±SE for 3 independent experiments.

* $p<0.05$ compared to control cells, # $p<0.05$ compared to TGFβ-stimulated Huh9.13 cells.

Fig.3. NS3-4A interactions and effects on TGFβ signaling pathway

(A) HEK-293T were cotransfected with GST-tagged viral ORFs and 3XFlag-tagged human ORFs. 3XFlag-tagged proteins were immunoprecipitated and tagged proteins were detected by western blotting.

(B) PAI-1 and SMAD7 expression measured by Q-PCR in selected Huh7 cells expressing NS3-4A after 6h-TGFβ stimulation. Mean±SE of cDNA quantity normalized by GAPDH for 3 independent experiments.

(C) Huh7 cells cotransfected with the Smad luciferase-reporter and NS3-4A expression vectors were stimulated with TGFβ during 6h. Mean±SE for 6 independent experiments.

(D-F) Huh7 cells were transfected with NS3-4A or control expression vector and stimulated with TGFβ during the indicated time. Phospho-SMAD2/3 or total SMAD3 were detected by western blotting (D). After integration of SMAD signals, the mean±SE phospho/total SMAD ratio for 4 to 6 experiments is reported (E, F).

* $p<0.05$ compared to control cells.

Fig.4. SMURF2 plays a crucial role in NS3-4A enhancer effect on TGFβ signaling

(A, B) Huh7 cells were co-transfected with NS3-4A and Smad luciferase-reporter with or without SMURF2 or SMURF2-C716A expression vectors and stimulated with TGFβ during 6h. (A) Effect of increasing amounts of SMURF2. (B) Comparison of SMURF2 and SMURF2-C716A overexpression. Mean±SE for 3 independent experiments. * $p<0.05$ compared to control cells; # $p< 0.05$ compared to NS3-4A transfected cells.

(C-E) Huh7 cells were transfected with NS3-4A with or without SMURF2 vector and stimulated with TGFβ during the indicated time. Phospho-SMAD2/3 or total SMAD3 were detected by western blotting (C). After integration of SMAD signals the mean±SE phospho/total SMAD ratio for 3 experiments is reported (D, E).

(F) Cells were transfected with si-RNA and with NS3-4A expression vector before TGFβ stimulation during 6h. Mean±SE for 3 independent experiments.

* $p<0.05$ compared to control cells

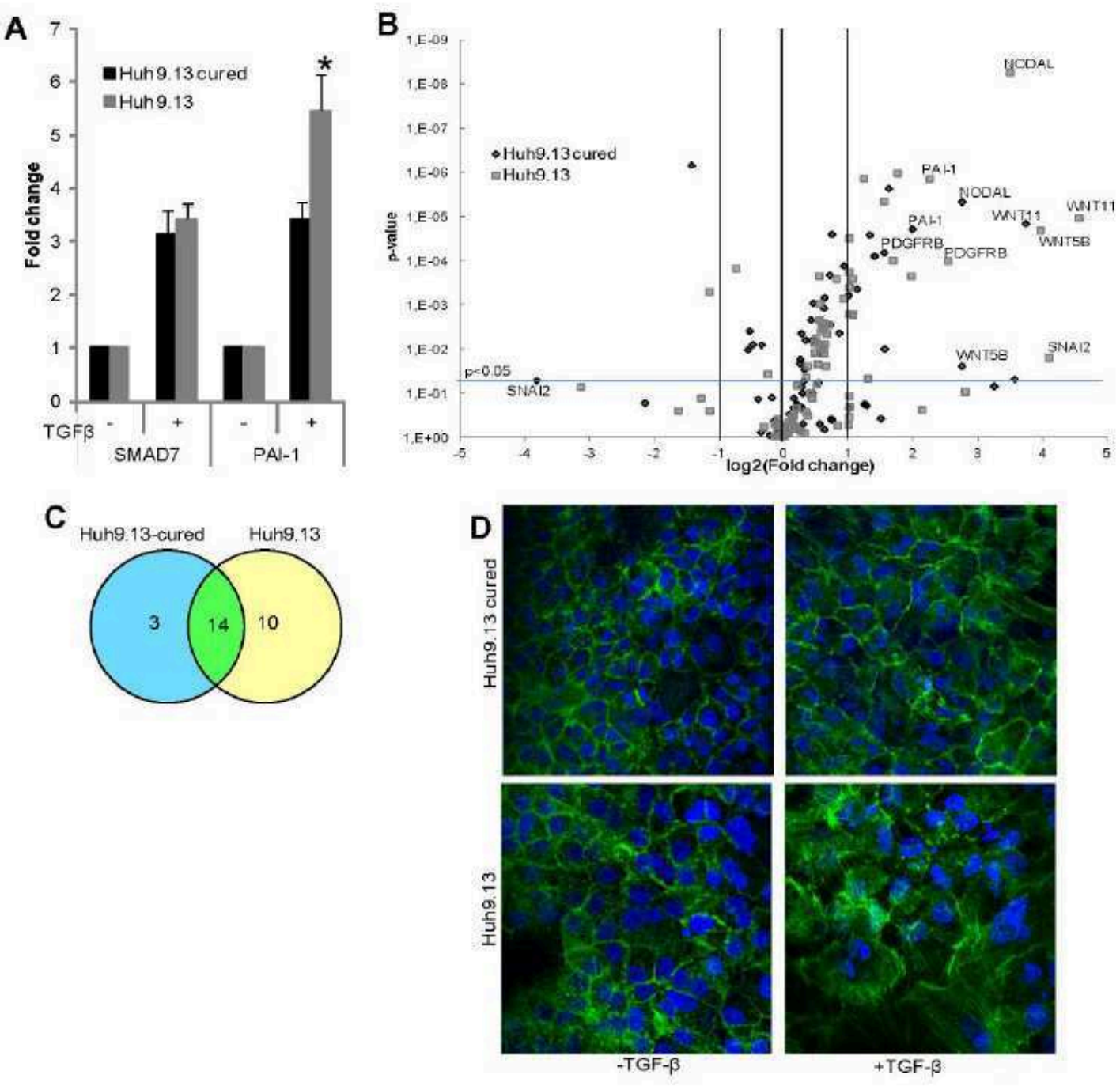


Fig.1. TGF-β induced EMT in cell expressing HCV subgenomic replicon

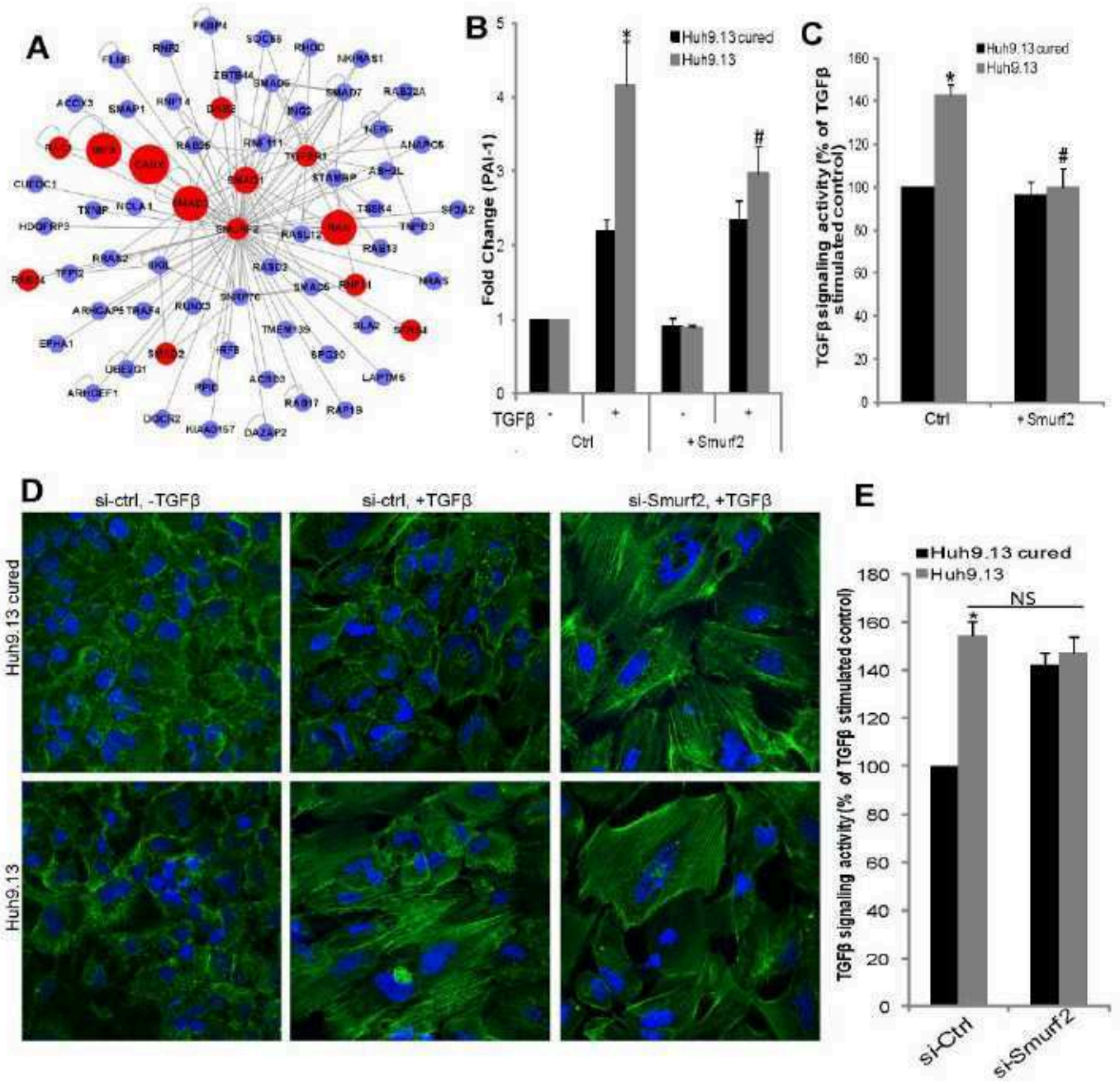


Fig.2. SMURF2 plays an important role in the enhancer effect of the subgenomic replicon

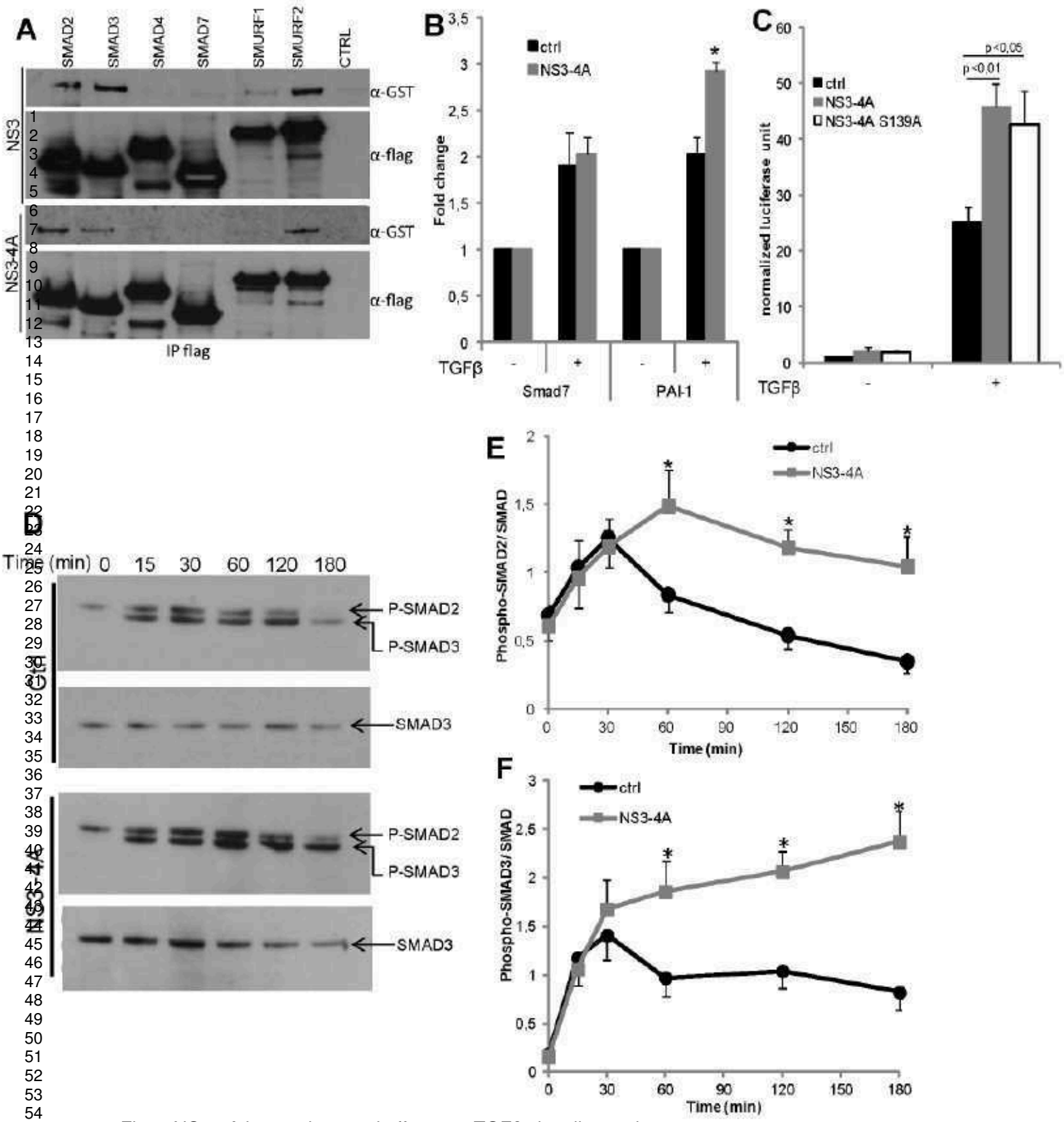


Fig.3. NS3-4A interactions and effects on TGFβ signaling pathway

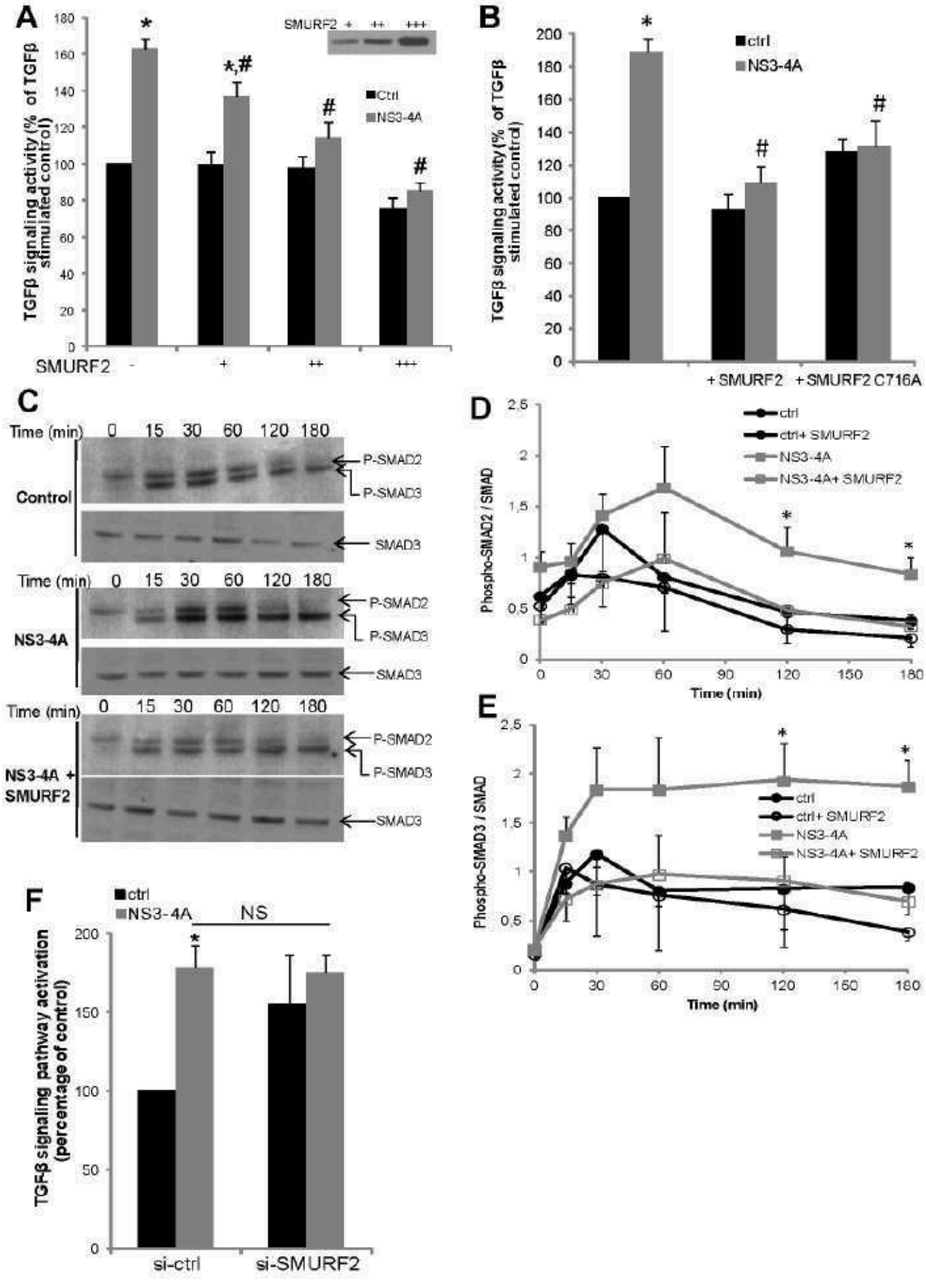


Fig.4. SMURF2 plays a crucial role in NS3-4A enhancer effect on TGFβ signaling

Supplementary material
Click here to download Supplementary material: 2012_09_06 Supplementary final.docx

Supplementary material and methods

Yeast two-hybrid array.

Viral ORFs from HCV con1 strain were cloned into bait vector (pGBKT7, Gal4 DNA-binding domain N-terminal fusion) and intracellular actors of the TGFβ signaling pathway were cloned into prey vector (pACT2, Gal4 transactivation domain N-terminal fusion). Bait and prey vectors were transformed into AH109 and Y187 yeast strains (Clontech), respectively. Yeasts were mated on synthetic medium lacking leucine and tryptophan (SD-L-W) to select diploids. Positive interactions were revealed by yeasts growing on SD-L-W lacking histidine (SD-L-W-H). Interaction robustness was estimated by addition of increasing doses of 3-amino-1,2,4-triazole (5 to 20 mM 3-AT, Sigma) a competitive inhibitor of the HIS3 gene product.

Pulse-chase analysis

The ORF of TβR-I was a kind gift of MF. Bourgeade (Inserm U785, centre hepato-biliaire, Villejuif). It was cloned in the vector pDS_X_HA (HA C-terminal fusion, http://www.signaling-gateway.org). HEK-293 cells were transfected with HA-tagged TβR-I. Cells expressing TβR-I were selected with 1 mg/mL G418.

HEK-293 cells stably expressing HA-tagged TβR-I were seeded in 10 cm dishes and transfected with NS3-4A or control expression vector. Twenty-four hours post-transfection, cells were incubated 1h in a cysteine/methionine free culture medium before labeling for 30 min at 37°C with 0.5 mCi/ml ^{35}S-methionine/cysteine. After washings at 4°C, cells were stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ and incubated at 37°C for the indicated chase times. Cells were washed in PBS before lysis in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitor cocktail

(Sigma)). TβR-I was immunoprecipitated with anti-HA agarose (Abcam) after 4 hour-incubation at 4°C. ^{35}S-labeled TβR-I was detected after SDS-PAGE separation using a PhosphorImager (GE Healthcare).

Supplementary figure legends

Supplementary figure 1.

A) NS5A detection by western blotting in Huh9.13 and Huh9.13-cured cells.

B) NS3 quantification by real time Q-PCR in Huh9.13 and Huh9.13-cured cells.

Supplementary figure 2.

Fluorescence quantification of phalloïdin staining. Huh9.13 and Huh9.13-cured cells were grown on coverslips. After TGFβ stimulation with 2.5 ng/mL for 48h, cells were stained with phalloïdin-FITC and Hoechst solution. The mean±SE green fluorescence intensity for 8 pictures is shown.* $p<0.01$, Student's test

Supplementary figure 3.

TGFβ signaling involves two dimeric receptors (TβR-I and II). Upon binding to TGFβ, TβR-II activates TβR-I, which in turn initiates signal transduction through the phosphorylation of receptor-specific SMAD (R-SMAD), SMAD2 and/or SMAD3. R-SMAD associate to SMAD4 to form an active transcription factor that binds to specific Smad-binding elements on DNA and regulates the transcription of numerous target genes. Among those, the inhibitory SMAD7 can down-regulate signal transduction either by inhibition of R-SMAD phosphorylation or by recruiting ubiquitin-ligases such as SMURF (SMURF1 and SMURF2) that induce the degradation of several actors of the pathway such as TβR-I and SMAD2.

Supplementary figure 4.

A) List of interactions between SMURF2 and its neighbors and viral proteins

B) Extinction of SMURF2 expression: Huh7 cells were transfected with 20 pM control si-RNA or si-RNA against SMURF2 and with pCI-neo-3XF-SMURF2 expression vector 4h later. Thirty hours post transfection, si-RNA efficacy was checked by western-blot with an anti-flag-HRP.

Supplementary figure 5.

A-C) Yeasts were transformed with viral or human protein expression vectors. After mating, yeasts expressing both proteins were grown on selective medium (SD-L-W). Interactions were identified by the ability of yeasts to grow on SD-L-W-H

A) Summary table of yeast two-hybrid array results. Pos: interaction detected. neg: no interaction detected, TA: transactivation of His3 by the viral protein, ND: not determined.

B) Representative yeast two hybrid results on SD-L-W-H, for NS3 full length and NS3 protease or helicase domains.

C) Results of yeast two-hybrid array on SD-L-W-H supplemented with 15 mM 3-AT selecting the most robust interactions.

Supplementary figure 6.

Huh7 cells were cotransfected with the Smad luciferase-reporter and the viral protein expression vectors. Twenty-four hours post transfection, cells were treated or not with (A) 1 µM BILN2061 (NS3-4A protease inhibitor, kind gift of D. Lamarre, University of Montréal, Canada [1]) or (B) 10 µM SB431542 (TβR-I

inhibitor) and stimulated with 2.5 ng/mL TGFβ during 6 h. Cells were lyzed and luciferase activity was monitored. The mean ± SE for 3 experiments is shown. * $p<0.05$, Student's test.

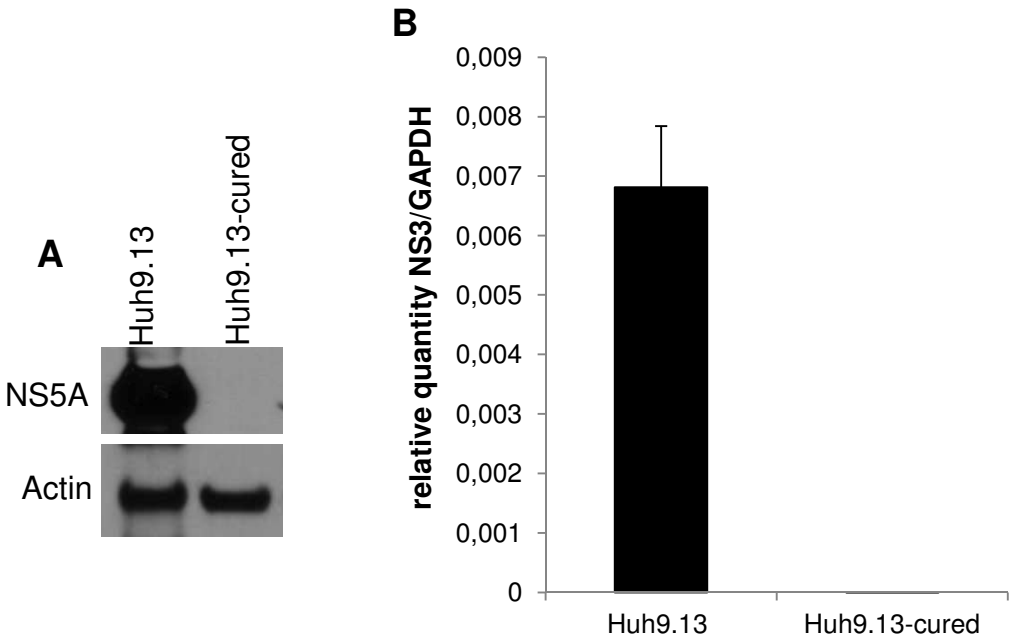
Supplementary figure 7.

A, B) HEK-293 cells stably expressing HA-TβR-I were transfected with NS3-4A or control expression vector. After ^{35}S-metabolic labeling of neosynthesized proteins for 30 min, cells were stimulated by 2.5 ng/mL TGFβ during the indicated times before lysis. TβR-I was immunoprecipitated before SDS-PAGE analysis A) ^{35}S-labeled TβR-I detection B) Quantification of TβR-I degradation. Mean±SE for 3 independent experiments.

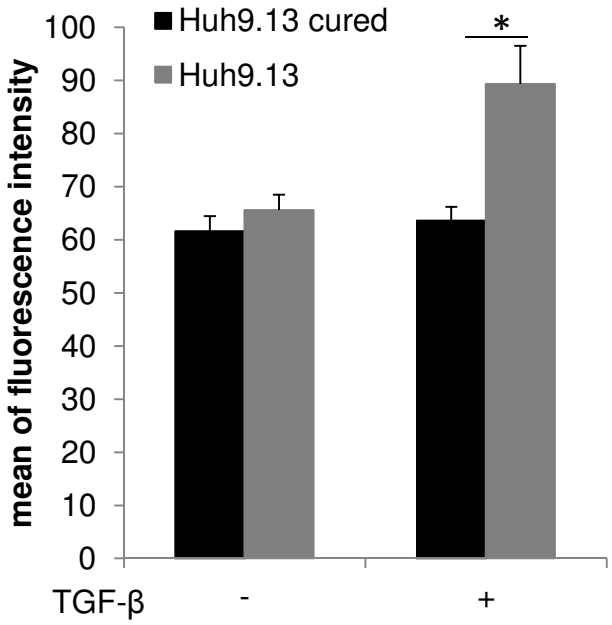
Supplementary references

[1] Llinàs-Brunet M, Bailey MD, Bolger G, Brochu C, Faucher A-M, Ferland JM, et al. Structure-activity study on a novel series of macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease leading to the discovery of BILN 2061. J Med Chem. 2004;47:1605–1608.

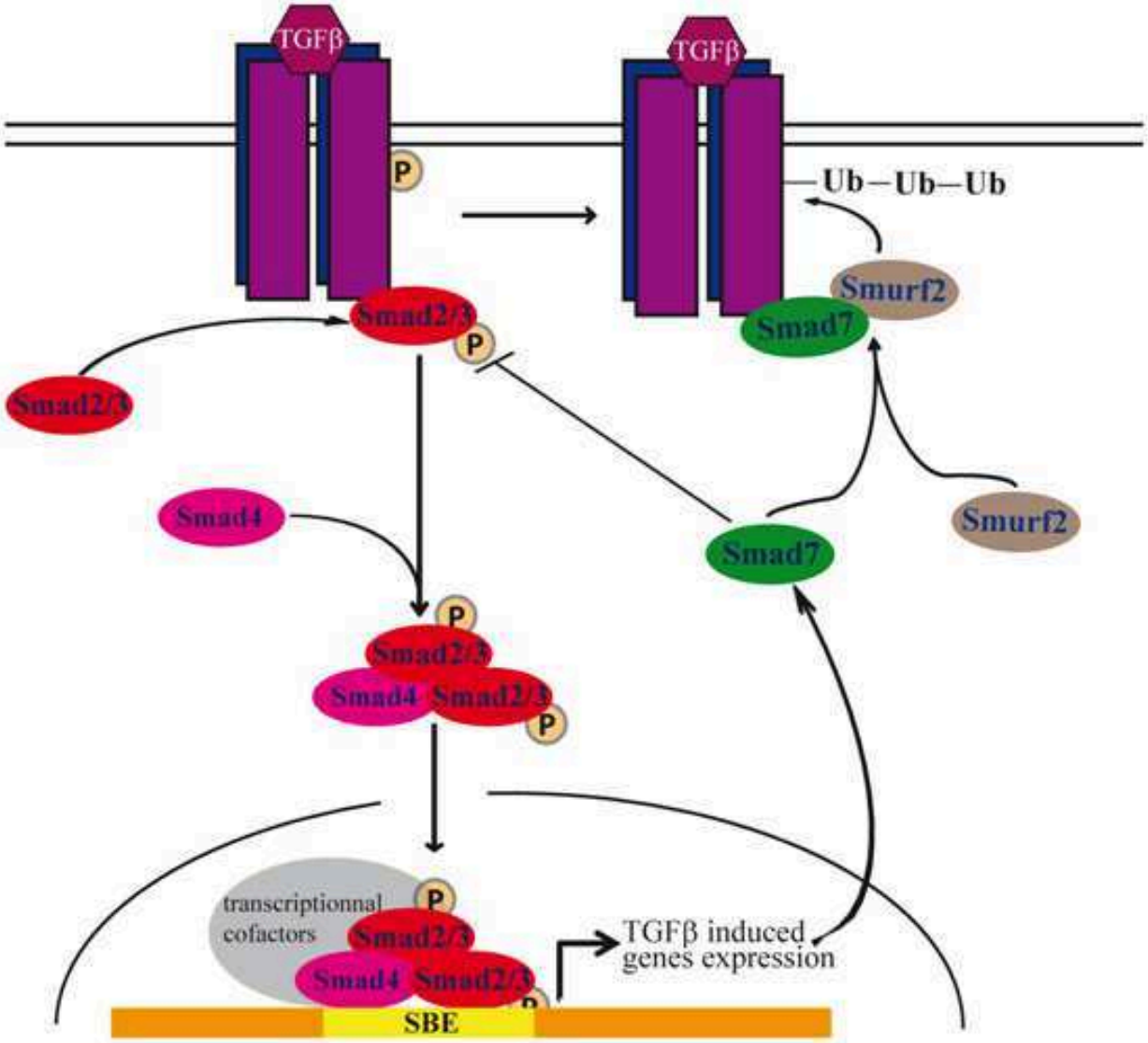
Supplementary fig 1



Supplementary fig 2



Supplementary fig 3

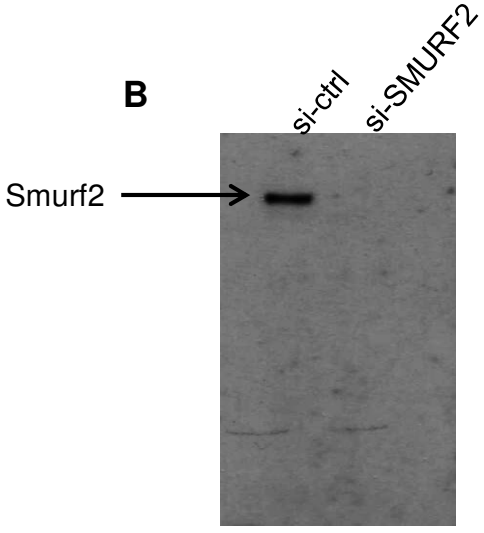


Supplementary fig 4

A

cellular protein	viral protein	virus	pmid
CANX	**E1 protein**	**Hepatitis C virus**	9557669 11602760
	E2 protein	**Hepatitis C virus**	9557669
	US11	Human herpesvirus 5 strain Merlin	15215855
	fusion protein	Measles virus	11765911
	Fusion protein (F)	Respiratory syncytial virus	11765911
	NULL	Vesicular stomatitis virus	7939687
DAB2	transforming protein	Human papillomavirus type 16	16038965
IRF3	BGLF4	Human herpesvirus 4 type 1	19052084
	K9	Human herpesvirus 8 type P	11314014
	transforming protein	Human papillomavirus type 16	15175323 9649509
	nucleocapsid protein	Measles virus strain Edmonston-Zagreb	11907205
RAB14	**protein F**	**Hepatitis C virus**	16237761
RAC1	p40	Human T-lymphotropic virus 1	14530271
RAN	Rep 78 protein	Adeno-associated virus - 2	18971280
	E1A	Human adenovirus 5	16763564
	32 kD protein	Human adenovirus C	12649209
	transforming protein	Human papillomavirus type 16	12649209
	large T antigen	Simian virus 40	12649209
RNF11	membrane protein	Vaccinia virus WR	19637933
SFRS4	Rep 78 protein	Adeno-associated virus - 2	18971280
SMAD1	E1A	Human adenovirus type 12	10497242
	inactive Cu-Zn superoxide dismutase-like in virion	Vaccinia virus WR	19637933
SMAD2	E1A	Human adenovirus type 12	10497242
SMAD3	**core protein**	**Hepatitis C virus**	15334054 16007207
	NS3 protease/helicase	**Hepatitis C virus**	15334054
	E1A	Human adenovirus type 12	10497242
	Tat	Human immunodeficiency virus 1	12758167 12202226
	transforming protein	Human papillomavirus type 5	17020941
TGFBR1	**NS5A**	**Hepatitis C virus**	16407286

B

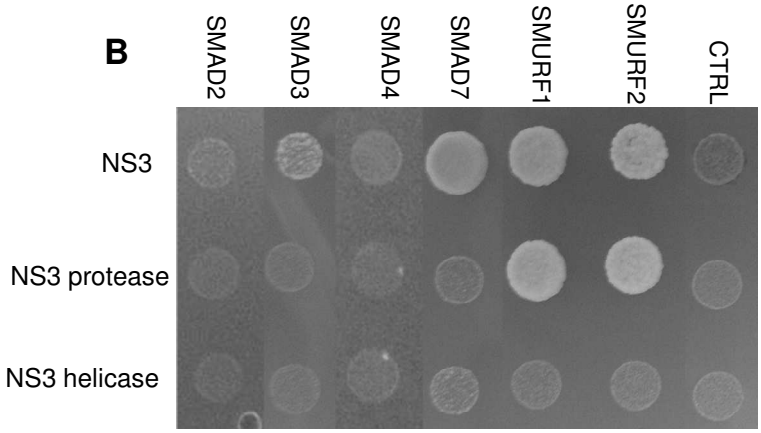


Supplementary fig 5

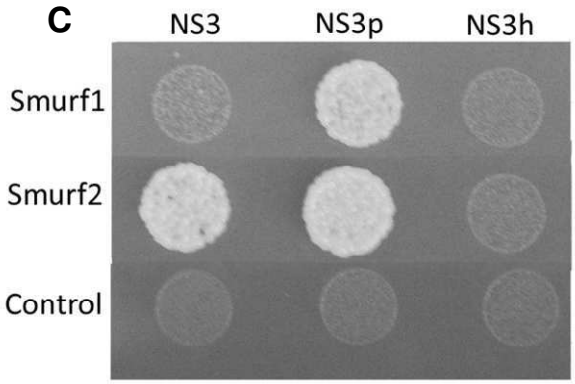
A

	core	E1	E2	NS2	NS3	NS3p	NS3h	NS4A	NS4B	NS5A	NS5A-mb	NS5B	NS5B-mb
Smad2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad3	neg	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad4	neg	ND	ND	ND	neg	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smad7	neg	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smurf1	neg	neg	neg	neg	**pos**	**pos**	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg
Smurf2	neg	neg	neg	neg	**pos**	**pos**	neg	neg	TA	TA	neg	neg	neg

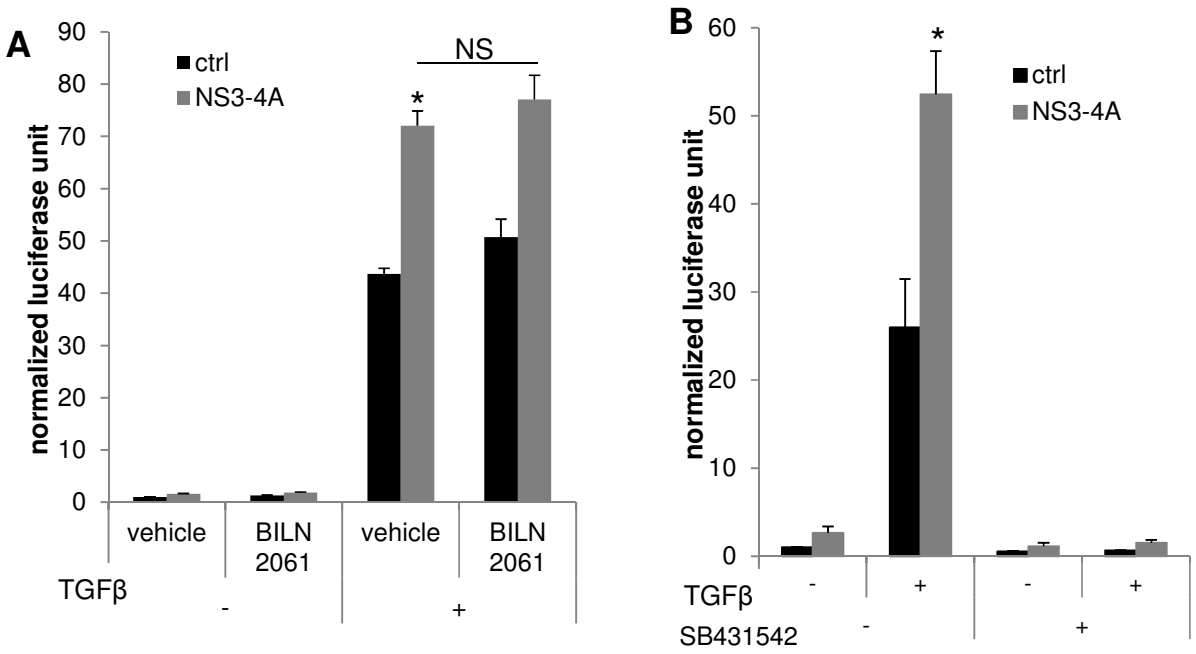
B



C



Supplementary fig 6



Supplementary fig 7

