

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I

THESE

Présentée à l'UFR des Sciences de la Vie  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Par

Audrey Codran

---

**Production de virus pseudotypes VSV/VHC,  
étude de la fusion du VHC avec les cellules hôtes.**

---

Soutenue publiquement le 18 mars 2003 devant la commission d'examen

Professeur Philippe Poindron :	Président, Rapporteur interne
Professeur Philippe Roingard :	Rapporteur externe
Docteur Thomas Baumert :	Rapporteur externe
Docteur Jean-Pierre Martin :	Directeur de thèse
Professeur Françoise Stoll-Keller :	Examineur

La difficulté de réussir ne fait qu'ajouter à la nécessité d'entreprendre.  
*Beaumarchais.*

S'il n'y a pas de solution, c'est qu'il n'y a pas de problème.  
*Jacques Rouxel (Les Shadoks).*

A Bertrand, ma famille et mes proches,

Si j'y suis arrivée, c'est grâce à vous !

# Merci...

Je tiens à remercier Madame le Docteur Anne-Marie Aubertin pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité. Vous avez toujours su me donner de bons conseils et je regrette que le temps m'ait manqué pour les mettre à profit.

Un très grand merci au Docteur Jean-Pierre Martin pour avoir supervisé ce travail. Ta perpétuelle bonne humeur et ton optimisme nous ont permis de franchir tous les obstacles que nous avons rencontré sur notre chemin. Tu as su être là quand il le fallait, tout en me laissant autonome et indépendante et pour cela, que dire de plus que merci ? C'était un vrai plaisir de travailler avec toi.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude envers Messieurs les Professeurs Philippe Poindron et Philippe Roingeard, ainsi qu'envers le Docteur Thomas Baumert qui m'ont fait l'honneur de faire partie du jury de cette thèse et d'en être les rapporteurs. J'ai été très touchée par votre enthousiasme et tous vos encouragements.

Merci à Madame le Professeur Françoise Stoll-Keller d'avoir accepté le rôle d'examineur dans ce jury. Ta gentillesse et ta disponibilité me manqueront.

Merci à Marie Paule Kieny pour avoir donné l'impulsion de départ à l'équipe VHC2.

A vous, Christine, Marie P., Jean-Daniel, François, Catherine, Maria, Isabelle, Marie W., les autres membres de l'équipe VHC2, que dire ? Nous avons partagé beaucoup de bons moments, de parties de tarot et autres soirées diverses et variées. Je penserai à vous et je vous souhaite à tous une très très bonne continuation, dans votre carrière, dans vos études et dans votre future vie de parents.

Aux petits nouveaux, Nadia et Stéphane, bonne chance pour la suite.

Merci à Michèle Bastien-Valle pour son aide lors des nombreux titrages que nous avons du faire. Merci aussi à Cathy Royer, tu prépares les hépatocytes

à merveille et tu t'es toujours montrée disponible pour me donner un coup de main quand j'en avais besoin.

A Murielle Ullmann et Anne Fuchs, merci d'avoir pris le temps pour sélectionner et tester les différents sérums de patients. Je regrette que nous n'ayons pas eu plus de temps pour continuer ce travail commun qui s'annonçait fort prometteur.

Merci à Nicolas Brignon et Stéphane Doridot, mes séjours à l'animalerie auront été de courte durée mais le déguisement en valait la peine...

A tout le groupe SHIV/HIV, Liliane, Christian, Sylvie, Géraldine, Dominique, Christiane, Sandrine, Vincent, Sandra et David, merci pour votre soutien. Les mots que vous avez eu lors de ce grand jour m'ont beaucoup touchée et émue.

Rosalba et Sigis, je ne saurai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous faites dans le laboratoire. Vous êtes tous deux d'une gentillesse rare. Que ferait-on sans vous ? Madame Moinet, je ne vous oublie pas non plus.

A mes amis d'ici, Virginie, Anne-Sophie, Sophie, Tristan, Marie, J-C (et oui, vous aussi vous être strasbourgeois maintenant), et ceux que je vais bientôt retrouver, Patrice, Carole, Viviane, Fabrice, Sylvie, merci pour vos encouragements et vos paroles de réconfort dans les moments de doute. Cette période alsacienne n'aurait pas été pareille sans vous.



<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>A- Le virus de l'hépatite C</b> .....	<b>1</b>
I- Historique .....	1
II- Généralités .....	2
III- Structure du VHC .....	3
IV- Organisation génomique .....	3
1. Région 5' non codante .....	3
2. Cadre de lecture ouvert .....	4
a- Protéines structurales .....	4
b- Protéines non structurales .....	7
3. Région 3' non codante .....	10
V- Cycle réplcatif du VHC .....	11
1. Etapes précoces.....	11
2. Synthèse des protéines virales .....	12
3. Réplication .....	13
4. Assemblage et excréation des virions.....	14
VI- Cinétiques de réplcation virale .....	14
1. Phase aiguë .....	15
2. Infection chronique.....	16
a- Les facteurs viraux.....	16
b- Le mode de transmission .....	17
c- La réponse immunitaire de l'hôte .....	17
d- Cinétique de réplcation virale.....	17
VII- Traitements .....	18
1. Traitement.....	18
2. Nouvelles thérapies.....	19
<b>B- Les modèles d'étude du VHC</b> .....	<b>21</b>
I- Les modèles animaux.....	21
1. Le chimpanzé.....	21
2. La souris.....	22
II- Les systèmes de culture cellulaire.....	23
1. Infection de cellules primaires et de lignées cellulaires.....	23
2. Mise en culture de cellules infectées <i>in vivo</i> .....	25
3. Transfection de lignées cellulaires par des clones VHC génomiques .....	26
4. Transfection de réplicons.....	26
III- Les « virus-like particles » (VLPs) .....	28
IV- Les liposomes .....	29
V- Les virus chimériques .....	30

<b>C- Les pseudotypes.....</b>	<b>32</b>
I- Généralités .....	32
II- Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV).....	34
1. Généralités .....	34
2. Structure des virions et du génome .....	34
3. Cycle réplcatif .....	35
4. VSV thermosensible <i>tsO45</i> .....	36
III- Production de virus pseudotypes .....	36
1. Généralités .....	36
2. Modification des protéines d'enveloppe du VHC .....	37
3. Expression des glycoprotéines modifiées du VHC dans la cellule hôte .....	38
<b>D- Pénétration du VHC dans la cellule hôte .....</b>	<b>39</b>
I- Généralités .....	39
II- Voies de pénétration dans la cellule.....	40
1. Endocytose clathrine-dépendante .....	40
2. Cavéole .....	41
3. Macropinocytose.....	42
4. Voie sans clathrine ni cavéole .....	43
III- Mécanisme de la fusion des virus .....	43
IV- VHC et fusion .....	45
<b><i>Avant-propos</i>.....</b>	<b>46</b>
<b><i>Publication n°1</i>.....</b>	<b>47</b>
<b><i>Publication 2</i>.....</b>	<b>81</b>
<b><i>Discussion</i>.....</b>	<b>113</b>
<b><i>Conclusion générale et perspectives</i> .....</b>	<b>123</b>
<b><i>Références bibliographiques</i>.....</b>	<b>124</b>

# Introduction

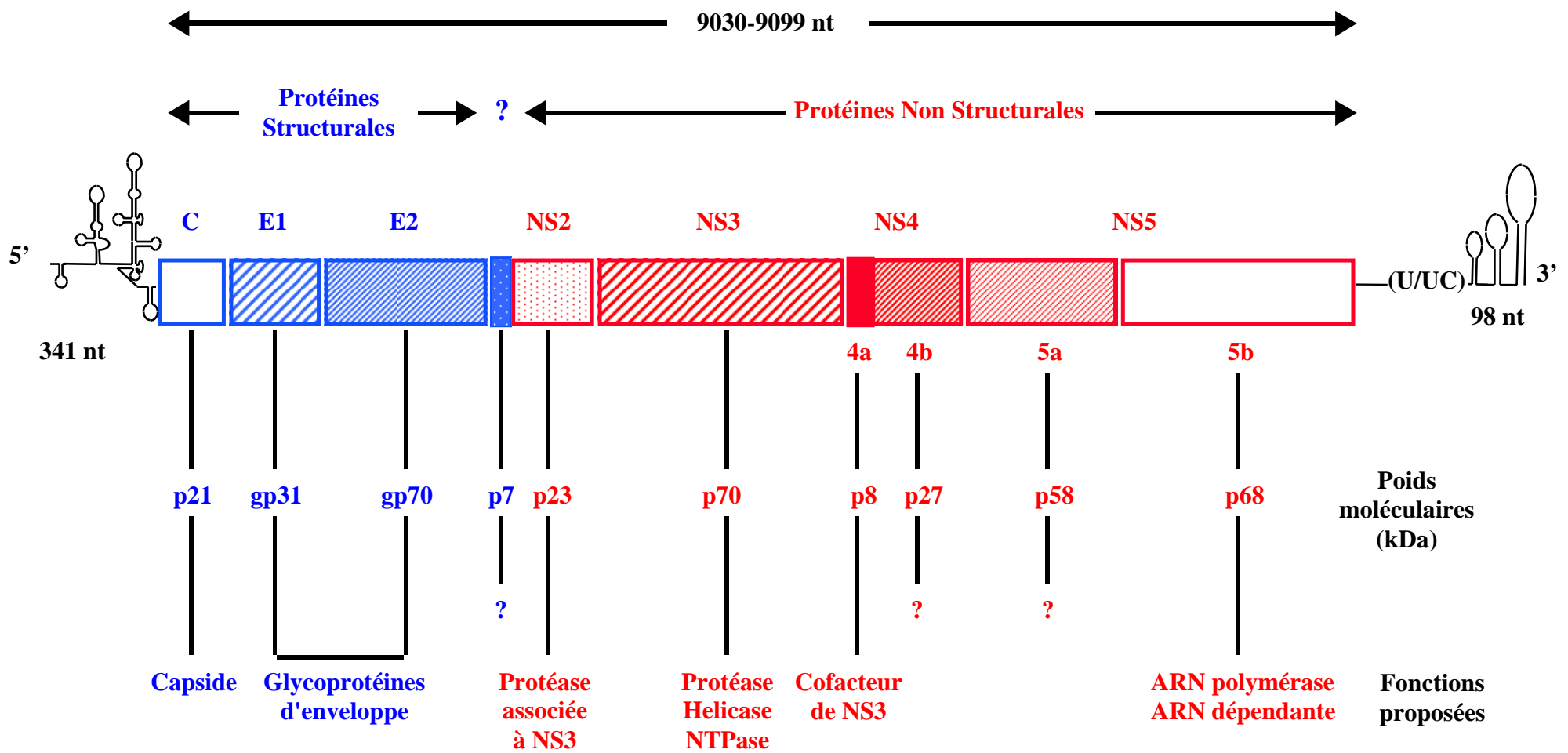


# Introduction

## A- Le virus de l'hépatite C

### I- Historique

Peu de temps après l'identification des hépatites A et B, un nouvel agent responsable de la plupart des hépatites post-transfusionnelles a été décrit. L'origine infectieuse de cette nouvelle hépatite a rapidement été suspectée, cette hypothèse étant basée sur l'observation clinique de patients qui avaient reçu des transfusions sanguines et sur l'observation expérimentale de chimpanzés qui avaient été inoculés par des sérums de patients ayant développé une hépatite non-A non-B. Après une période d'incubation de 1 à 3 mois, ces chimpanzés ont développé tous les symptômes cliniques d'une hépatite qui devenait fréquemment chronique (revue : Bonkovsky & Mehta, 2001). Au début des années 80, cet agent a été caractérisé comme un microorganisme de 50 nm de diamètre, possédant probablement une enveloppe lipidique (Bradley *et al.*, 1983, 1985). Il aura fallu attendre 1989 et les progrès de la biologie moléculaire pour que le génome du virus responsable des hépatites non-A non-B, devenu depuis le virus de l'hépatite C (VHC), soit entièrement connu (Choo *et al.*, 1989).



**Figure 1** : Organisation génomique du VHC.

## **II- Généralités**

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé, membre de la famille des *Flaviviridae*. Son génome consiste en une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive, d'une taille d'environ 9600 nucléotides (nt) (Fig. 1). Il code une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (aa) qui est clivée par des protéases cellulaires et virales pour donner naissance à 4 protéines structurales (Core, E1, E2 et p7), 6 protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) et une nouvelle protéine, F, dont la fonction n'est pas encore connue. L'organisation de son génome est similaire à celle des autres membres de la famille des *Flaviviridae* et il a été classé dans un nouveau genre créé spécialement pour lui : les hepacivirus.

Le VHC présente une remarquable variabilité génétique due principalement à l'absence d'une fonction de « relecture » de l'ARN polymérase virale (NS5B). A l'heure actuelle, plus de 30 génotypes, répartis en 11 groupes ont été répertoriés. La nomenclature actuelle a permis de réduire le nombre de génotypes à 6 (noté de 1 à 6), chacun réparti en sous-types, selon la classification suivante : HCV-1a, -1b, -2a, 2b, etc...(revue : Kato, 2000). La distribution géographique et le génotype sont étroitement liés : par exemple, en Europe et en Amérique du nord, le génotype 1a est prédominant alors que les génotypes 1b et 2 (a, b et c) sont plus fréquents en Asie (Mizokami & Orito, 1999).

Chez les patients infectés, le VHC est également distribué en quasi-espèces, variants viraux génétiquement distincts mais apparentés, tous dérivés du même inoculum (Weiner *et al.*, 1991, Martell *et al.*, 1992). La diversité des quasi-espèces joue un rôle dans la physiopathologie de l'infection, dans les mécanismes de persistance virale, dans la résistance aux traitements ainsi que dans la récurrence de l'infection après transplantation.

### **III- Structure du VHC**

La molécule d'ARN du VHC est protégée par une capsid, elle-même entourée d'une enveloppe dérivée des membranes cellulaires et dans laquelle sont insérées deux glycoprotéines virales (Shimizu *et al.*, 1996). Grâce à des analyses sur des gradients de densité, deux populations virales ont été identifiées dans les sérums de patients infectés : une fraction de forte densité qui est supposée être constituée de particules virales libres ou complexées à des immunoglobulines, et une fraction de densité plus faible très infectieuse où les particules virales sont associées à des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Prince *et al.*, 1996).

### **IV- Organisation génomique**

La structure du génome du VHC est typique de celle des *Flaviviridae*. Il contient des régions terminales 5' et 3' très conservées qui bordent un cadre de lecture ouvert d'environ 9 kb.

#### **1. Région 5' non codante**

D'une taille de 341 nucléotides, elle ne comporte pas de coiffe méthylée. Dans le cas du VHC, la traduction se fait par l'intermédiaire d'un site interne d'entrée du ribosome (internal ribosome entry site, IRES). Cette région comporte 3 à 5 codons AUG non-initiateurs de la traduction, 4 domaines riches en tiges-boucles (le domaine IV contenant le codon AUG initiateur) et un pseudo-nœud localisé dans le domaine III (Honda *et al.*,

1999). L'IRES est constitué par les domaines II, III et IV. Cette structure fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet la traduction du cadre de lecture ouvert. Les premiers nucléotides du cadre de lecture ouvert (20 à 40 nucléotides) semblent être impliqués dans le repliement de l'IRES et donc dans son fonctionnement (Rijnbrand *et al.*, 2001).

## 2. Cadre de lecture ouvert

### a- *Protéines structurales*

#### - Protéine de capsid

La protéine de capsid Core est une protéine très basique de 21 kDa, localisée dans le cytoplasme à proximité des membranes périmoléaires et du réticulum endoplasmique. Sa séquence est très conservée d'un génotype à l'autre et elle possède un fort pouvoir antigénique. Sa polymérisation entraîne la formation des capsides virales. De nombreuses fonctions lui ont été attribuées, telles la régulation de gènes cellulaires, dans divers modèles *in vitro* mais leur existence *in vivo* reste controversée. L'analyse de sa séquence a montré l'existence d'un site putatif de liaison à l'ADN, de signaux de localisation nucléaire et de sites de phosphorylation. Il a été montré que la protéine Core est capable d'activer le promoteur c-myc et le promoteur de l'interleukine 2 (IL-2) entre autres. Core ne semble pas s'associer directement à l'ADN mais pourrait moduler l'expression de certains gènes par l'intermédiaire de protéines cellulaires. *In vitro*, Core inhibe l'activité du promoteur p53 et l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF (tumor necrosis factor). Ces observations suggèrent un rôle de Core dans la régulation du cycle cellulaire (Ray & Ray, 2001).

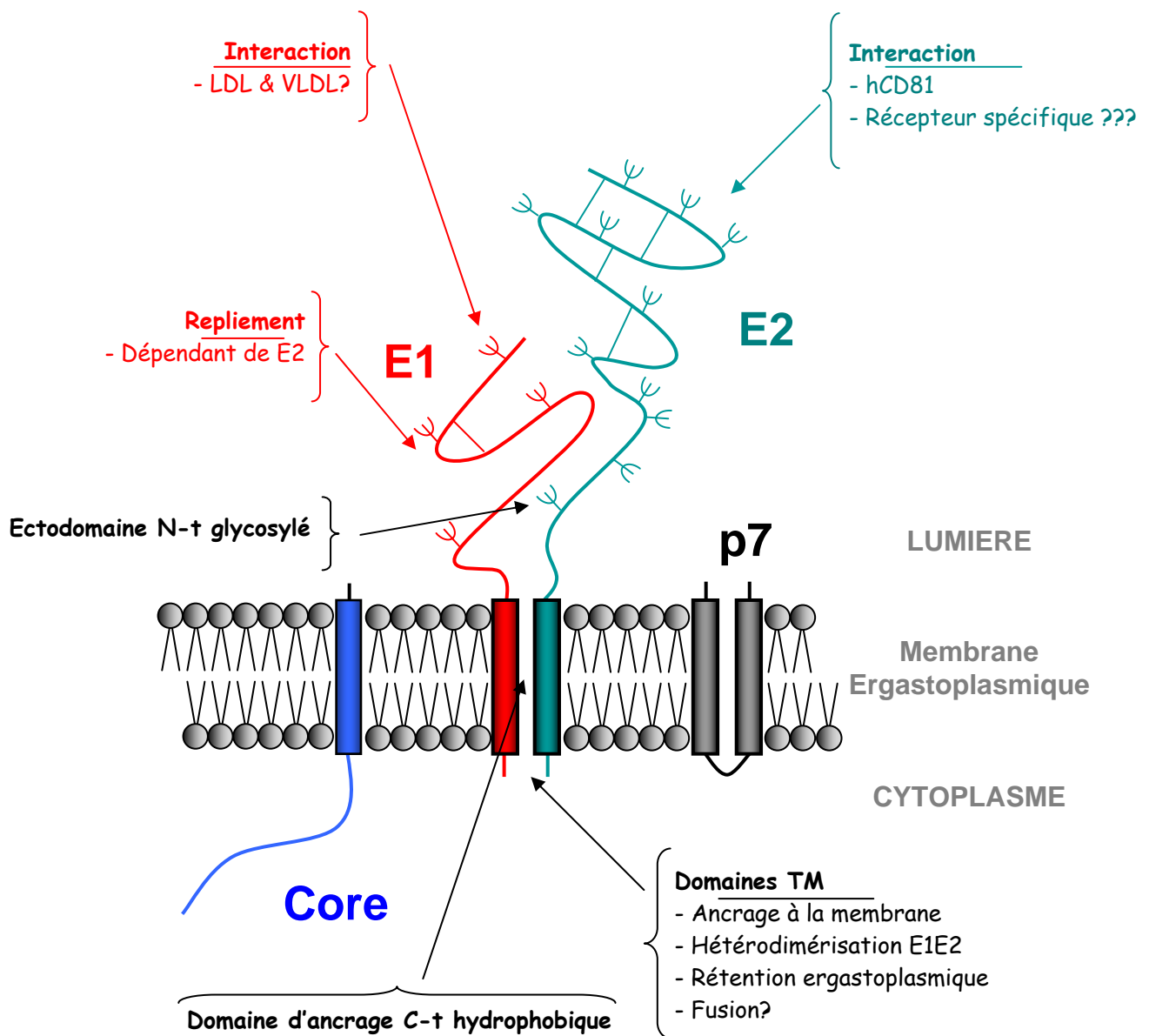
Core pourrait également intervenir dans les mécanismes d'apoptose. *In vitro*, elle peut inhiber ou activer l'apoptose selon le type cellulaire, intervenir dans la régulations de

promoteurs et activer des facteurs transcriptionnels. Par exemple, dans les cellules humaines HeLa, Core inhibe l'apoptose médiée par la cisplatine, un agent anti-cancéreux. En revanche, dans les cellules de hamster CHO, Core induit l'apoptose en activant le gène *c-myc*. (revues : Suzuki *et al.*, 1999, Ray & Ray, 2001, Rosenberg, 2001).

Une nouvelle protéine résultant d'un décalage  $-2/+1$  bases du cadre de lecture (frame shift) au début de la séquence codante de Core, au niveau du codon 11, a récemment été mise en évidence (Xu *et al.*, 2001, Ogata *et al.*, 2002, Varaklioti *et al.*, 2002). La présence d'anticorps dirigés contre cette protéine, appelée F, dans les sérums de patients, ainsi que sa conservation entre différents isolats du VHC suggèrent un rôle important de cette protéine dans le cycle viral.

#### - Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (figure 2)

L'enveloppe d'un virus étant un élément essentiel de l'infection, de nombreuses études se sont portées sur la caractérisation des glycoprotéines E1 et E2. Après clivage de la polyprotéine, E1 et E2 sont fortement N-glycosylées, E1 possédant 6 sites de glycosylation potentiels et E2 en possédant 11 pour le génotype 1a (Dubuisson, 2000). La glycoprotéine E2 possède une région immunodominante hypervariable (HVR1) dans sa partie N-terminale (Kato *et al.*, 1992). Il est désormais établi que E1 et E2 sont localisées dans le réticulum endoplasmique de façon naturelle (Dubuisson *et al.*, 1994), qu'elles sont associées par l'intermédiaire de leurs domaines transmembranaires (Cocquerel *et al.*, 2000, Op De Beeck *et al.*, 2000) sous forme d'hétérodimères (Deleersnyder *et al.*, 1997), et que l'expression de E2 est indispensable au correct repliement de E1 (Dubuisson & Rice, 1996). Le signal de rétention dans le RE de E1 et E2 est localisé dans les régions transmembranaires de ces deux protéines (Cocquerel *et al.*, 1998, 1999, Flint &



**Figure 2 :** Représentation schématique des hétérodimères des glycoprotéines E1 et E2 du VHC.

McKeating, 1999). Des formes tronquées de E1 (à l'acide aminé 311) et E2 (à l'acide aminé 611), quant à elles, sont efficacement secrétées (Michalak *et al.*, 1997).

L'assemblage de E1 et E2 se fait par deux voies distinctes : une voie dite « productive » qui permet la formation d'hétérodimères stabilisés par des interactions non-covalentes, et une voie « non productive » qui aboutit à la formation d'agrégats liés par des ponts disulfures, capables d'interagir avec des protéines chaperonnes BiP et la calréticuline (Op De Beeck *et al.*, 2001). Cette voie pourrait jouer un rôle dans la régulation négative du virus afin de réduire l'expression des antigènes viraux et/ou la pathogénicité de l'infection. La voie productive comprend des étapes successives de repliement et d'association.

- p7

Le rôle de cette protéine de 7 kDa n'est pas encore connu. Elle ne semble pas nécessaire à l'assemblage des virions. Une étude récente a permis de la connaître un peu mieux (Carrère-Kremer *et al.*, 2002). La protéine p7 possède deux domaines transmembranaires, ces extrémités C-terminale et N-terminale étant orientées vers le milieu extracellulaire. De plus, le domaine transmembranaire C-terminal possède une fonction de séquence signal, capable d'induire la translocation d'un gène reporter dans la lumière du RE. Il a très récemment été montré que p7 était capable de s'assembler en hexamères afin de former un canal ionique (Griffin *et al.*, 2003).



## *b- Protéines non structurales*

### - NS2

C'est une protéine transmembranaire de 23 kDa, insérée dans la membrane du RE (Yamaga & Ou, 2002). Associée à la partie N-terminale de NS3, elle forme une protéase autocatalytique dont l'activité est fortement associée aux acides aminés His-952 et Cys-993 et stimulée par le zinc (Hijikata *et al.*, 1993). Des analyses cristallographiques (Kim *et al.*, 1996) et biochimiques (Steinkuhler *et al.*, 1996) ont clairement démontré que le zinc est essentiel à l'intégrité structurale et donc à l'activité protéasique de NS3. Cependant, on ne sait pas à l'heure actuelle si NS2 est capable de fixer ces ions ou si leur effet activateur n'est pas simplement dû au correct repliement de NS3.

### - NS3 et NS4A

D'un poids moléculaire de 67 kDa, NS3 possède un domaine protéase dans sa partie N-terminale et une activité NTPase/hélicase dans sa partie C-terminale. L'activité sérine protéase de NS3 assure les clivages des jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Failla *et al.*, 1994). La formation d'un hétérodimère avec NS4A, protéine transmembranaire de 54 aa, est indispensable à l'activité sérine protéase de NS3. La structure cristallographique de NS3 a permis d'identifier 2 domaines similaires, chacun formé par 6 feuillets  $\beta$ . NS4A interagit avec NS3 au niveau des 22 aa N-terminaux de NS3 (Love *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1998). Cette interaction provoque des changements conformationnels importants qui permettent la stabilisation du site catalytique de l'enzyme. Le zinc est également un élément important dans l'activité protéase de NS3. Son site de fixation est localisé à l'opposé du site catalytique de l'enzyme. Il aurait donc plus un rôle dans la structure que dans l'activité enzymatique elle-même (De Francesco *et al.*, 1996).

Les sites de clivage de la protéase NS3/NS4A sont bien identifiés. En *cis*, le clivage se fait après une thréonine alors qu'en *trans*, il a lieu après une cystéine.

Le domaine NTPase/hélicase de NS3 est quand à lui constitué des 450 aa C-terminaux de la protéine (Kim *et al.*, 1997). L'activité hélicase interviendrait lors de la réplication pour séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN viral. Ce mécanisme permettrait également de dérouler les structures secondaires des ARN afin de favoriser la traduction des protéines virales ou de rendre accessible à la polymérase virale des zones très structurées telles que l'IRES ou la région X située dans le domaine 3' non-traduit. L'activité NTPase de NS3 concerne préférentiellement l'ATP et le dATP et elle est dépendante des ions bivalents  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ . L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est utilisée par le domaine hélicase pour séparer les duplex ARN/ARN. La cristallisation de la région NTPase/hélicase de NS3 a permis de montrer que cette région est formée de 3 domaines séparés par des sillons, l'oligonucléotide se logeant dans celui séparant le deuxième et le troisième domaine (Kim *et al.*, 1998). La partie hélicase de NS3 serait également impliquée dans la régulation de la transduction du signal par une protéine kinase dépendante de l'AMPc et semble avoir un rôle dans la survie et la prolifération de la cellule hôte (Aoubala *et al.*, 2001).

#### - NS4B

C'est une petite protéine de 27 kDa intégralement insérée dans la membrane du RE et orientée vers le cytoplasme (Hugle *et al.*, 2001). Elle induit la formation de structures membranaires qui dérivent du RE et qui contiennent le complexe de réplication (Egger *et al.*, 2002). Elle interagit avec NS5B et module son activité catalytique (Piccininni *et al.*, 2002). NS4B pourrait avoir des propriétés transformantes *in vitro* (Park *et al.*, 2000).

- NS5A

Après le clivage, NS5A est principalement phosphorylée au niveau des résidus sérine, mais aussi sur certains résidus thréonine, et existe sous deux formes distinctes (56 et 58 kDa). La phosphorylation de la région centrale et de la région C-terminale donne naissance à la forme p56, alors que la forme p58 résulte d'une hyperphosphorylation dépendante de NS3, NS4A et NS4B (Tanji *et al.*, 1995). Sa localisation à proximité des membranes du RE lui permet de s'associer avec les autres protéines NS (Polyak *et al.*, 1999). Son rôle au sein du complexe est encore mal connu mais serait de réguler l'activité de la polymérase virale (Shirota *et al.*, 2002).

Les principales propriétés de NS5A concerneraient la pathogenèse de l'infection. Lorsque NS5A est délétée de sa partie N-terminale, elle agit comme activateur de transcription *in vitro*. Cette activité pourrait avoir un rôle physiologique car il semble que NS5A soit clivée par une protéase cellulaire, en amont du site transactivateur. De plus, NS5A possède un signal de localisation nucléaire en aval de ce site (Pawlotsky & Germanidis, 1999). De nombreuses interactions entre NS5A et des protéines cellulaires ont été rapportées mais leurs significations physiologiques restent à démontrer. L'existence d'une région déterminant la sensibilité à l'interféron (ISDR) dans la partie C-terminale de NS5A a été proposée. De plus, il a été montré que NS5A interagit avec la protéine kinase R (PKR), un des médiateurs de la résistance à l'interféron, qui est activée par la présence d'ARN double brin dans la cellule. Le domaine d'interaction de la PKR sur NS5A recouvre l'ISDR et l'interaction NS5A/PKR est rompue lorsque des mutations apparaissent dans l'ISDR, ce qui correspond à une sensibilité du VHC à l'interféron. Il a également été établi que NS5A empêche la dimérisation de la PKR, ce qui a pour conséquence de réprimer cette kinase et la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 $\alpha$ .

Ces observations suggèrent que NS5A joue un rôle important dans le blocage de la réponse antivirale médiée par l'interféron (Suzuki *et al.*, 1999).

#### - NS5B

C'est l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. NS5B est une protéine phosphorylée de 68 kDa, localisée à proximité des membranes péri-nucléaires. Au sein du complexe de réplication, elle s'associe aux autres NS et sans doute à d'autres protéines cellulaires (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). Sa structure est celle d'une main droite avec des doigts, un pouce et une paume. La polymérase du VHC semble peu flexible contrairement aux autres polymérases (Lesburg *et al.*, 2000). L'activité polymérasique de NS5B est due à 4 motifs conservés (Lohmann *et al.*, 1997). L'extrémité 3' de l'ARN repliée en épingle à cheveux servirait d'amorce à la synthèse d'ARN. Le premier nucléotide incorporé est soit un ATP, soit un GTP.

### 3. Région 3' non codante

Cette région se décompose en 3 zones de 5' en 3' : une région d'environ 30 nucléotides, variable selon la souche, une région poly U/C de longueur variable et une région très structurée de 98 nucléotides, la région X. Cette dernière est repliée en 3 tiges-boucles et semble jouer un rôle important dans la synthèse du brin non-codant au cours de la réplication. De plus, elle est capable de fixer une polypyrimidine tract-binding protein (PTB) qui est impliquée dans la traduction médiée par l'IRES (Kolykhalov *et al.*, 1996).

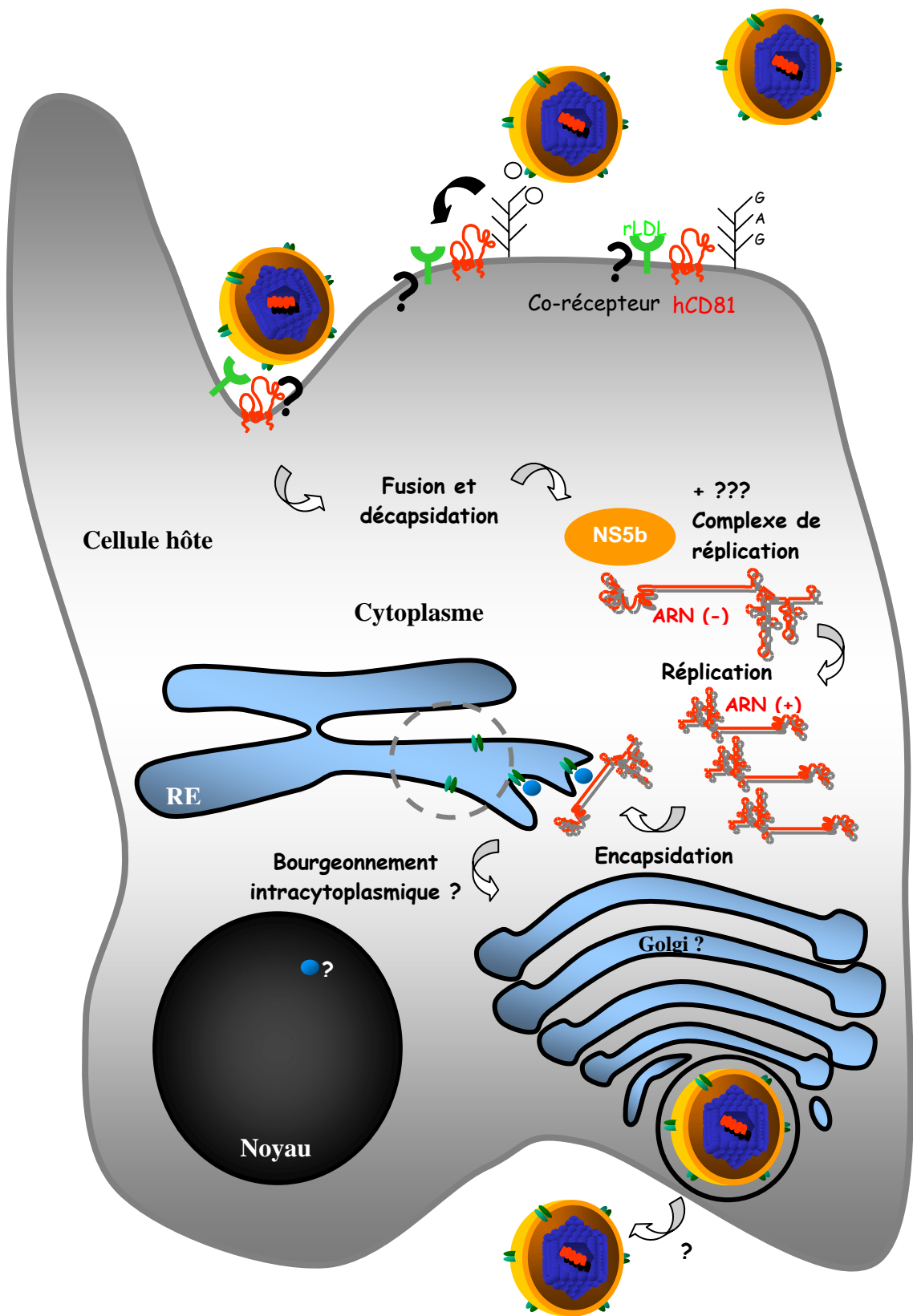
## V- Cycle répliatif du VHC (Fig. 3)

### 1. Etapas précoces

La ou les molécules impliquées dans la fixation et l'internalisation du VHC ne sont pas encore identifiées. Plusieurs candidats récepteurs ont cependant été proposés. La molécule de surface CD81 (de la famille des tétraspanines) est capable de fixer spécifiquement la glycoprotéine E2 *in vitro* (Pileri *et al.*, 1998). Bien que cette interaction ne soit pas associée à l'internalisation des virions (Petracca *et al.*, 2000), elle peut entraîner des modifications métaboliques de la cellule (Wack *et al.*, 2001). Le fait que cette molécule soit présente à la surface de nombreux types cellulaires n'explique pas le tropisme restreint du VHC.

Le deuxième candidat proposé est le récepteur des LDL (low density lipoprotein). Les virions étant tapissés de LDL, ils pourraient interagir avec ce récepteur et cette interaction donnerait lieu à l'internalisation des particules (Agnello *et al.*, 1999).

Les glycosaminoglycanes (GAGs) ont également été proposés comme des récepteurs de faible affinité du VHC (Germi *et al.*, 2002). Les GAGs sont des chaînes polysaccharidiques présentes à la surface de nombreux types cellulaires. Les GAGs étant fortement exprimés et de façon ubiquitaire, ils représentent une cible idéale pour des interactions de faible affinité avec les virus. Le but de cette interaction serait de rapprocher la particule virale de son récepteur de forte affinité et ainsi permettre l'entrée du virus dans la cellule. Le rôle des GAGs dans la fixation du virus de la dengue à la cellule hôte a été démontré et des motifs capables de lier les GAGs ont été identifiés sur des protéines d'enveloppe d'autres *Flaviviridae* (Chen *et al.*, 1997).



**Figure 3 :** Cycle réplcatif du virus de l'hépatite C.

Il a récemment été identifié une molécule de surface responsable de la fixation de E2, sur cellules humaines hépatocytaires HepG2 : le « human scavenger receptor class B type I » (SR-BI) (Scarselli *et al.*, 2002). Le SR-BI appartient à la superfamille de CD36, protéines de surface capable de lier des lipoprotéines entre autres. SR-BI est un récepteur fortement exprimé dans les hépatocytes et il a été montré que son ligand naturel, le HDL (high density lipoprotein) était internalisé par endocytose, indépendamment de la clathrine (Babitt *et al.*, 1997, Silver *et al.*, 2001).

Le candidat récepteur décrit pour le VHC est le récepteur des asialoglycoprotéines ASGP-R (Saunier *et al.*, 2003). Cette molécule, présente à la surface des cellules hépatiques appartient à la famille des lectines et est capable de fixer les résidus galactoses ou N-acétylgalactosamines N-terminaux des glycoprotéines.

Peu de choses sont connues sur les étapes ultérieures du cycle viral. Par analogie avec les autres membres des *Flaviviridae*, on peut cependant supposer que les génomes viraux sont libérés dans les endosomes après endocytose, puis relargués dans le cytoplasme de la cellule infectée.

## 2. Synthèse des protéines virales

La traduction débute par le positionnement de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'IRES, par l'intermédiaire des domaines II et III. La fixation du facteur d'initiation de transcription eIF3 à l'IRES et à la sous-unité 40S provoque un changement de conformation du complexe (Spahn *et al.*, 2001). Le codon initiateur AUG se retrouve alors en face de l'ARNt-Met. D'autres facteurs sont indispensables au bon fonctionnement de l'IRES : la sous-unité 60S du ribosome, les protéines ribosomales S9 et S5, le facteur d'initiation eIF2 ainsi que la protéine PTB. La région 3' non codante pourrait aussi jouer

un rôle sur l'activité de l'IRES mais les résultats obtenus restent controversés (Ito *et al.*, 1998, Murakami *et al.*, 2001, Wood *et al.*, 2001, Kong & Sarnow, 2002).

La polyprotéine est ensuite clivée par des protéases cellulaires et virales. Les protéines structurales sont clivées par une signal-peptidase localisée dans la lumière du RE (Grakoui *et al.*, 1993). La protéine Core devient mature après clivage de son extrémité C-terminale (Yasui *et al.*, 1998). Les protéines E1 et E2 subissent également des modifications telles que des N-glycosylations, des changements de conformation et des hétérodimérisations avant de devenir des glycoprotéines d'enveloppe fonctionnelles (Dubuisson, 2000).

La jonction NS2/NS3 est clivée par l'action auto-catalytique d'une protéase virale constituée par NS2 et par le domaine N-terminal de NS3. NS3 s'associe ensuite à son cofacteur NS4A pour cliver le reste des jonctions situées en aval. Les protéines NS5A et NS5B sont phosphorylées. De plus, NS5A pourrait être secondairement clivée par une protéase cellulaire dans sa région N-terminale. Le produit résultant de ce clivage est caractérisé par une localisation nucléaire et possède des activités d'activateur transcriptionnel (Suzuki *et al.*, 1999, Rosenberg, 2001).

### 3. Réplication

Le complexe de réplication est formé par l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B associée aux autres protéines NS et comportant probablement des protéines cellulaires. Le complexe est associé aux membranes et vésicules périnucléaires qui semblent être le siège de la réplication. La première étape de la réplication est la synthèse d'un brin d'ARN non codant qui servira ensuite de matrice pour la synthèse de nouveaux brins génomiques (Ishido *et al.*, 1998).



#### 4. Assemblage et excrétion des virions

Les étapes finales du cycle du VHC restent pour l'heure mal connues. Il est cependant probable que l'assemblage soit déclenché par une interaction entre l'ARN génomique et des protéines de capsid, aboutissant ainsi à la formation de la nucléocapside. (Shimoike *et al.*, 1999). Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 étant localisées dans le RE, et par analogie avec les autres *Flaviviridae*, il est possible de penser que les nucléocapsides s'entourent de leur enveloppe par bourgeonnement dans le RE et que les particules virales soient excrétées par exocytose.

#### **VI- Cinétiques de réplication virale**

Le foie des patients infectés est constitué d'hépatocytes infectés et d'hépatocytes non infectés. Le réservoir d'hépatocytes infectés est renouvelé par l'infection des nouveaux hépatocytes par des virions produits en grande quantité. En parallèle, les hépatocytes infectés sont éliminés par apoptose et une grande majorité de particules virales produites par ces cellules est libérée dans la circulation générale. Leur dégradation est alors rapidement effectuée par des mécanismes encore inconnus, mettant en jeu des phénomènes physiques et immunologiques (Neumann *et al.*, 1998). L'existence de sites extra-hépatiques de réplication virale est fortement suspectée. En effet, l'ARN du VHC a pu être détecté dans le sperme (Dore & Kaldor, 2000, Leruez-Ville *et al.*, 2000, Bourlet *et al.*, 2002, Pasquier *et al.*, 2003), dans les tissus cérébraux (Vargas *et al.*, 2002), dans les cellules du col de l'utérus (Manavi *et al.*, 2002), dans le liquide céphalo-rachidien (Laskus *et al.*, 2002), dans le système biliaire (Haruna *et al.*, 2001), dans la cornée (Lee *et al.*, 2001) ou encore dans les glandes salivaires (Arrieta *et al.*, 2001, Hermida *et al.*, 2002).

L'existence de ces sites extra-hépatiques de réplication du VHC pourrait expliquer que, suite à une transplantation hépatique, le greffon est réinfecté rapidement et 20 à 30 % des patients développent une cirrhose dans les 5 ans suivant la greffe (Rosen, 2002).

## 1. Phase aiguë

Après une exposition accidentelle au VHC, la période d'incubation varie de 6 à 7 semaines environ, mais elle peut être beaucoup plus courte (2 semaines) ou s'étendre jusqu'à plus de 20 semaines. Chez les adultes infectés, seuls 30 à 40 % présentent des symptômes lors de la phase aiguë, symptômes qui ne sont pas différents de ceux observés lors des autres hépatites. La plupart des patients asymptomatiques ont des taux de transaminases fluctuants. Les cas d'hépatites C fulminantes sont rares. De plus, il semblerait que le virus en lui-même ne soit pas responsable, mais que ces hépatites fulminantes soient dues à une forte réponse immunitaire cytotoxique. En effet, dans une étude réalisée sur 26 patients présentant une hépatite fulminante, l'ARN du VHC n'a pu être détecté dans seulement 5 cas (Bonkovsky & Mehta, 2001).

Concernant la cinétique de réplication virale lors de la phase aiguë, seuls les résultats obtenus chez des chimpanzés infectés expérimentalement sont disponibles (Major *et al.*, 1999). Chez ces animaux, la charge virale passe par une augmentation exponentielle biphasique, la première phase étant rapide pendant les deux premières semaines, la deuxième phase étant plus lente et se prolongeant pendant les 3 à 5 semaines suivantes. La sécrétion de cytokines induite par l'infection pourrait expliquer le ralentissement observé au cours de la deuxième phase. Cette augmentation biphasique est ensuite suivie par un plateau puis par une décroissance significative concomitante du pic de transaminases et de

la séroconversion. Après cette décroissance, l'infection évolue soit vers la guérison, soit vers la persistance.

En phase aiguë, les patients infectés par le VHC présentent une histologie hépatique similaire à celle observée pour les autres hépatites bien que les modifications du métabolisme lipidique des hépatocytes, de type stéatose, soient plus fréquemment observées lors d'une infection par le VHC.

## 2. Infection chronique

Le développement de la chronicité dépend de nombreux facteurs, tels que le virus en lui-même, le mode de transmission du virus et la réponse immunitaire de l'hôte (revue : Bonkovsky & Mehta, 2001).

### *a- Les facteurs viraux*

Le principal facteur viral impliqué dans le développement de la chronicité est le génotype. Il a été établi qu'une infection par le génotype 1b provoque des modifications histologiques plus importantes que les autres génotypes. Une étude réalisée en Italie a montré que le taux moyen d'évolution vers la chronicité était de 59,5 % et que ce taux s'élevait jusqu'à 92 % lorsque les patients étaient infectés par le génotype 1b (Bonkovsky & Mehta, 2001).

#### *b- Le mode de transmission*

La quantité de virus inoculée lors de l'infection est déterminante pour l'évolution de la maladie. Ainsi, les personnes infectées lors d'une transfusion présentent une maladie plus grave et développent plus fréquemment une cirrhose que les patients infectés par le partage de seringues contaminées.

#### *c- La réponse immunitaire de l'hôte*

Plusieurs études ont été menées sur le sujet. Il apparaît que les personnes qui résolvent l'infection sont majoritairement de type caucasien, qu'elles ont développé une infection aiguë sévère (ictère) et présentent un titre viral plus faible. Cependant, il est impossible d'établir un tableau clinique reproductible malgré les analyses statistiques effectuées lors d'études épidémiologiques. L'intensité de la réponse humorale et cellulaire lors de l'infection aiguë reste le principal facteur déterminant de la guérison ou du passage à la chronicité.

#### *d- Cinétique de réplication virale*

Le suivi des patients traités par l'interféron a permis de décrire, lors d'une infection chronique, un équilibre entre la production et la dégradation des particules virales : l'infection de nouveaux hépatocytes est contrebalancée par la mort par apoptose des cellules hépatiques infectées. La dégradation importante des virions circulant dans le sang périphérique compense quand à elle la libération de nouvelles particules dans la circulation générale. En effet, il a été estimé que la demi-vie moyenne des particules circulantes est de

moins de trois heures et que la production, équivalente à la clairance, est de  $10^{12}$  particules par jour. Ceci a pour conséquence une charge virale constante au cours de l'infection chronique. La demi-vie des cellules infectées est très variable d'un patient à l'autre mais elle est en général comprise entre 2 et 70 jours. Cet équilibre de réplication est modifié par les traitements administrés, anti-viraux et immuno-modulateurs (Neumann *et al.*, 1998).

## **VII- Traitements**

A l'heure actuelle, aucun vaccin contre le VHC n'est disponible, sans doute en raison du grand nombre de génotypes et de sous-types et de l'absence de modèle d'étude pratique du VHC. Le seul traitement aujourd'hui disponible est l'interféron- $\alpha$  seul ou en combinaison avec un analogue nucléotidique, la ribavirine.

### **1. Traitement**

Le mécanisme exact par lequel l'IFN exerce son activité antivirale n'est pas encore complètement déterminé. Deux enzymes cellulaires sont activées par l'IFN : l'oligo- adénylate synthétase (OAS) et la protéine kinase ARN-dépendante (PKR). L'activation de l'OAS provoque la dégradation de l'ARN viral. L'activation de la PKR va, quant à elle, entraîner la phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 $\alpha$ , bloquant ainsi la traduction des ARNm et la réplication virale (revue : Samuel, 2001). Des études ont montré que 40 % des patients traités à l'IFN répondent à la thérapie et que 70 % d'entre eux rechutent à l'arrêt du traitement. Le génotype a aussi son importance puisque les patients infectés par un génotype 1 sont moins bons répondeurs à l'IFN que les patients infectés par les autres

génotypes (Davis & Hoofnagle, 1986, Damen & Bresters, 1998). L'efficacité du traitement par l'IFN- $\alpha$  serait également affectée par d'autres facteurs tels que l'âge, la durée de l'infection ou la diversité des quasi-espèces. L'IFN- $\alpha$  a cependant des effets secondaires non négligeables : syndromes grippaux plus ou moins prononcés (fièvre, fatigue, courbature musculaire, maux de têtes), dépression, perte de poids, nausées, diarrhées... (Damen & Bresters, 1998).

Afin d'augmenter l'efficacité du traitement à l'IFN, la ribavirine lui a été associée. La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanine. Bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore totalement élucidé, plusieurs hypothèses ont été proposées. L'administration de ribavirine à des patients chroniquement infectés pourraient permettre la réduction de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires en inhibant la synthèse totale d'ADN, d'ARN et de protéines et en induisant l'apoptose des cellules localisées dans les zones inflammatoires. De plus, la ribavirine jouerait un rôle dans la synthèse des particules virales en inhibant la synthèse des protéines virales (Meier *et al.*, 2003). Finalement, la ribavirine augmenterait l'expression du CD40-ligand à la surface des lymphocytes CD4+, ce qui aurait pour conséquence d'amplifier l'action anti-virale de l'IFN- $\alpha$  (Bergamini *et al.*, 2002).

## 2. Nouvelles thérapies

Plusieurs groupes se sont intéressés au développement de l'interféron- $\alpha$  pégylé, généré par des modifications des résidus lysine par le polyéthylène glycol. En augmentant la taille de la molécule, la pégylation permet d'augmenter la demi-vie de l'interféron et de diminuer son taux de clairance. Par conséquent, l'activité biologique de la forme pégylée persiste plus longtemps et la monothérapie par l'IFN- $\alpha$  pégylé est plus efficace que celle

par l'IFN- $\alpha$  non pégylé. Finalement, la tolérance de l'IFN- $\alpha$  pégylé est la même que pour l'IFN- $\alpha$  classique (Baker, 2001). L'interféron- $\alpha$  pégylé peut également être administré en combinaison avec la ribavirine.

Actuellement, un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) est proposé comme traitement des infections par le VHC. L'IMPDH est une enzyme essentielle dans le métabolisme des purines, qui catalyse la synthèse des guanines requises pour la prolifération lymphocytaire. Il a été montré que le VX-497 (inhibiteur de l'IMPDH) pouvait inhiber de façon spécifique la prolifération de lymphocytes humains, murins, canins et de rat (Jain *et al.*, 2001), ce qui limiterait l'inflammation du foie.

Des antiviraux spécifiques du VHC sont également à l'étude, parmi lesquels des molécules ciblant l'extrémité 5' non traduite, des inhibiteurs de la protéase NS3 et des inhibiteurs de la polymérase NS5B (revue : Wang & Heinz, 2000).

## B- Les modèles d'étude du VHC

L'absence de système de culture cellulaire pour répliquer le VHC, et de modèle animal, a grandement ralenti son étude. Certains types cellulaires comme les hépatocytes primaires humains, des cellules d'origine hépatique, d'origine lymphocytaire T ou B, ont été décrits comme étant capable de répliquer le VHC mais à un niveau tel que la réplication du virus ne peut être détectée que par RT-PCR nichée (Shimizu *et al.*, 1992, Ito *et al.*, 1996, Mizutani *et al.*, 1996). Diverses stratégies ont été élaborées pour permettre la compréhension du cycle réplcatif du VHC.

### I- Les modèles animaux

#### 1. Le chimpanzé

Les données disponibles concernant des caractères cliniques proviennent d'études réalisées sur des cohortes de patients infectés depuis un certain temps, souvent plus de 10 ans et donc, peu de choses sont connues sur les événements relatifs aux premiers mois après l'infection. A l'heure actuelle, le seul modèle animal pour l'étude de l'infection par le VHC est le chimpanzé. Contrairement aux patients infectés, les chimpanzés peuvent être suivis dès l'inoculation. Comme les humains, les chimpanzés présentent des taux de clairance du virus relativement élevés (Bassett *et al.*, 1998), ce qui en fait un excellent modèle d'étude des mécanismes impliqués dans l'élimination du virus. Le chimpanzé est également utilisé dans le cadre d'essais vaccinaux. Il a ainsi été possible de montrer que l'inoculation à un chimpanzé d'un clone d'ARN infectieux (clone H77, génotype 1a) induit



une infection par le VHC et que les chimpanzés ayant complètement résolu l'infection avaient développé une réponse lymphocytaire T mémoire capable de les protéger d'une ré-infection (Major *et al.*, 2002). L'analyse de la réponse humorale a montré que les chimpanzés qui guérissent de la maladie présentent un pic d'anticorps anti-VHC entre 4 et 20 semaines post-infection, alors que les chimpanzés chroniquement infectés ne développent des anticorps qu'entre 100 à 200 semaines post-infection. La mesure de la prolifération lymphocytaire indique une augmentation de la réponse cellulaire T lors des phases précoces de l'infection chez les animaux en voie de guérison par rapport aux animaux qui évoluent vers la chronicité (Shata *et al.*, 2002).

Bien que le chimpanzé soit un excellent modèle d'étude du VHC, son usage reste limité pour des raisons éthiques et économiques.

## 2. La souris

D'une façon naturelle, la souris n'est pas sensible à une infection par le VHC. Cependant, une équipe canadienne a récemment réussi à générer des souris possédant un foie chimère humain/murin (Mercer *et al.*, 2001). La première étape a consisté à croiser des souris *Alb-uPa* (porteuses d'un transgène exprimant l'urokinase sous contrôle du promoteur albumine) avec des souris *SCID* immunodéficientes. L'expression du transgène chez les souris *Alb-uPA* induit la mort des hépatocytes murins. Ainsi, les cellules humaines greffées, ne portant pas le transgène sont favorisées et le foie est repeuplé par des hépatocytes humains en compétition avec des hépatocytes murins qui ont éliminé le transgène. Après repeuplement du foie, les hépatocytes humains représentent jusqu'à 50 % de la masse cellulaire du foie. L'injection de sérums de patients infectés à ces animaux

provoque une virémie persistante avec des titres similaires à ceux observés chez l'homme dans 75 % des cas.

Ce modèle présente de nombreux avantages : la réplication du VHC a lieu dans son environnement naturel , c'est-à-dire les hépatocytes humains au contraire de ce qui peut être fait chez le chimpanzé. De plus, l'infection a pu être réalisée avec différents isolats viraux, montrant ainsi la sensibilité du système au virus sauvage.

### **VIII- Les systèmes de culture cellulaire**

De nombreux essais ont été réalisés dans le but de propager le virus de l'hépatite C *in vitro*, afin d'étudier la réplication du virus. Cependant, pour des raisons encore inconnues, cela s'est avéré très difficile. Ces systèmes ont montré leurs limites, tant au niveau de la reproductibilité des expériences, que par le faible niveau de réplication du virus.

#### **1. Infection de cellules primaires et de lignées cellulaires**

Afin de rester le plus proche possible de l'hôte naturel du VHC, plusieurs groupes ont utilisé des cellules primaires humaines ou de chimpanzés pour essayer de propager le virus. Par exemple, Iacovacci et collaborateurs (Iacovacci *et al.*, 1993, 1997) ont infecté des hépatocytes primaires de fœtus humains par des sérums de patients mais ce système s'est révélé être d'une faible efficacité. Les essais réalisés sur hépatocytes de chimpanzés n'ont pas permis d'augmenter l'efficacité de réplication du virus (Lanford *et al.*, 1994). Cependant, dans une étude utilisant des hépatocytes primaires humains, les auteurs ont pu

détecter la présence du génome viral jusqu'à 3 mois après infection, par une technique de RT-PCR quantitative (Rumin *et al.*, 1999). Il convient néanmoins de rester prudent à la vue de ces résultats car de nombreux facteurs ont pu influencer le système : le pouvoir infectieux de l'inoculum qui est difficile à prévoir car il ne peut pas être corrélé avec le titre en ARN génomique, ainsi que les composés présents dans le sérum utilisé comme les anticorps anti-VHC. De plus, la qualité des hépatocytes obtenus après isolement et les particularités intrinsèques du donneur ne sont pas des paramètres négligeables.

Dans le but de respecter le tropisme naturel du VHC, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) ont également été utilisées. Dans l'étude de Cribier et collaborateurs (Cribier *et al.*, 1995), des PBMCs ont été infectées par 2 sérums différents présentant des hauts titres VHC. Sur des cultures provenant de 10 donneurs, 7 ont permis la détection de l'ARN génomique jusqu'à 28 jours post-infection. De plus, le brin non codant du VHC a pu être détecté de façon intermittente dans les cellules infectées, apportant la preuve de la réplication du VHC dans ces cellules. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque des pools de cellules provenant de donneurs différents ont été utilisés. Comme dans les autres systèmes, le virus s'est répliqué à un faible niveau.

L'utilisation des cellules primaires n'étant pas des plus aisées, les efforts dans la mise au point d'un système de réplication du VHC se sont orientés vers un système utilisant des cellules immortalisées. Deux types de lignées ont été plus particulièrement étudiés : les lignées humaines d'origine hépatique telles que les cellules HepG2, Huh-7 ou PH5CH et les lignées d'origine lymphoïde telles les cellules MOLT-4, MT-2 et Daudi. La lignée hépatocytaire humaine PH5CH a été immortalisée à l'aide de l'antigène T du SV40 (Noguchi & Hirohashi, 1996). Ces cellules se sont révélées être les cellules d'origine hépatique les plus susceptibles à une infection par le VHC. En effet, une analyse de l'ARN a montré que le VHC se répliquait durant toute la période de culture et ceci a été confirmé

par l'apparition de variants dans la région HVR1 (Kato *et al.*, 1996). Différentes conditions de culture ont été testées afin d'augmenter le taux de réplication du virus comme par exemple l'utilisation d'un milieu ne contenant pas de sérum de veau fœtal ou d'un milieu supplémenté en lovastatine, molécule utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Ces deux conditions de culture ont pour conséquence de stimuler l'expression du récepteur des LDL et donc, devraient permettre une meilleure fixation du virus aux cellules (Agnello *et al.*, 1999). Cependant, même dans ces conditions, la réplication du virus n'a pas été augmentée (Seipp *et al.*, 1997).

Parmi les lignées d'origine lymphoïde, les cellules MT-2 (lignée lymphocytaire T humaine infectée par le HTLV-1) sont capables de répliquer le virus jusqu'à 198 jours post-infection et certaines sous-espèces deviennent prédominantes au cours de la période de culture (Mizutani *et al.*, 1996). Les cellules Daudi, d'origine lymphocytaire B, semblent être également de bons candidats en étant capables de répliquer le VHC plus d'un an après infection (Nakajima *et al.*, 1996). Il a également été montré que le surnageant de cellules Daudi infectées par le VHC pouvait être utilisé pour inoculer des chimpanzés, malgré un pouvoir infectieux relativement faible (Shimizu *et al.*, 1998).

## 2. Mise en culture de cellules infectées *in vivo*

Etant donné que les systèmes décrits précédemment ne sont pas très efficaces pour propager le VHC, il a été entrepris de mettre en culture des cellules isolées à partir de patients chroniquement infectés. Deux types de cellules ont été utilisés dans cette approche : les hépatocytes primaires et les PBMCs. L'approche utilisant les hépatocytes primaires a vite montré ses limites. En effet, la faible disponibilité de ces cellules et le faible taux de réplication du VHC (la quantification par incorporation d'uridine tritiée

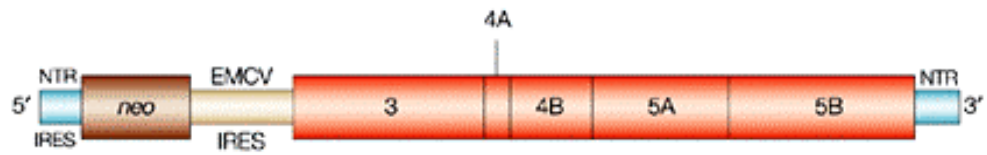
montre une augmentation de seulement 5 fois par rapport au témoin) dans ces conditions n'en font pas un excellent modèle (Ito *et al.*, 1996). Les PBMCs de patients chroniquement infectés représentent une meilleure alternative de par leur disponibilité mais leur capacité à répliquer le virus reste faible (seulement  $10^4$  copies après 5 jours de culture) (Muller *et al.*, 1993).

### 3. Transfection de lignées cellulaires par des clones VHC génomiques

Cette technique présente plusieurs avantages comparée à l'infection de cellules par des sérums de patients infectés. Premièrement, l'inoculum est homogène et bien défini. Deuxièmement, le génome peut être synthétisé en grande quantité. Et finalement, le génome peut être manipulé à volonté et permettre ainsi l'analyse des différents aspects du cycle du VHC, à l'exception des étapes très précoces telles la reconnaissance du récepteur et la fusion. Malheureusement, cette approche s'est révélée bien décevante car mis à part deux études (Yoo *et al.*, 1995, Dash *et al.*, 1997) rapportant la répllication du VHC après transfection d'un ARN synthétique dans des cellules HepG2 et Huh-7, aucun travail n'a présenté de résultats concernant l'analyse d'un génome réplificatif ou l'infection de chimpanzés par des virus produits par cette technique.

### 4. Transfection de réplicons

La preuve d'une répllication du virus après transfection se heurte à plusieurs problèmes techniques. Tout d'abord, le VHC n'est pas cytolitique et par conséquent les techniques de virologie classique, comme l'utilisation des plages de lyse par exemple, ne



**Figure 4:** Représentation schématique d'un réplicon subgénomique exprimant les protéines non structurales du VHC, de NS3 à NS5B.

peuvent pas être utilisées. Ensuite, de grandes quantités d'ARN sont nécessaires lors de la transfection. Cet ARN est très stable et peut être détecté pendant une durée relativement longue après transfection (jusqu'à 3 semaines), même en absence de réplication (Lohmann *et al.*, 1999). Troisièmement, étant donné le faible taux de réplication, des techniques très sensibles doivent être utilisées (Gunji *et al.*, 1994, Lanford *et al.*, 1994). Finalement, la production d'un intermédiaire ARN de polarité négative est le seul témoin de la réplication du VHC et sa détection par RT-PCR reste très délicate en raison des grandes quantités d'ARN transfectées qui peuvent être sources de contamination.

Afin de s'abolir des problèmes énoncés ci-dessus, l'équipe de Ralf Bartenschlager a mis au point un système de réplicon subgénomique VHC dont la réplication est stable (Lohmann *et al.*, 1999). Ces ARN synthétiques sont dérivés d'une séquence génomique VHC consensus qui a été isolée à partir de tissus hépatiques de patients chroniquement infectés (Koch & Bartenschlager, 1999, Lohmann *et al.*, 1999). Cette séquence a été délétée de la partie codant les protéines structurales et les auteurs n'ont conservé que la partie codant les protéines non structurales, avec ou sans la protéase NS2. Un gène marqueur de résistance à la néomycine a également été introduit, ainsi que l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Les constructions bicistroniques ainsi obtenues se présentent de la façon suivante : le premier cistron comporte le gène de résistance sous contrôle de l'IRES du VHC, le deuxième cistron code les protéines non structurales du VHC sous contrôle de l'IRES de l'EMCV (Figure 4). Après transfection, les cellules Huh-7 sont maintenues sous sélection néomycine. Les colonies ainsi obtenues présentent des taux de réplication des constructions bicistroniques nettement supérieurs à ceux observés avec les méthodes décrites précédemment.

L'équipe de R. Bartenschlager a également développé des réplicons génomiques, contenant la totalité du génome VHC. En conservant la pression de sélection néomycine,

les lignées porteuses des réplicons ont pu être propagées pendant plus de 2 ans, sans signe de cytopathogénicité ni ralentissement de la croissance (Pietschmann *et al.*, 2001). L'analyse génétique des réplicons a montré l'apparition de mutations adaptatives qui permettent une meilleure efficacité de transcription (Lohmann *et al.*, 2001). Ces mutations sont dispersées le long de la séquence codante mais la plus forte augmentation de la réplication est due à la substitution d'un seul acide aminé (en position 2884 sur la polyprotéine) dans NS5B. Des mutations adaptatives ont également été identifiées dans la région codant NS5A (Blight *et al.*, 2000). Cependant, ces mutations d'adaptation à la culture cellulaire modifie l'infectivité *in vivo*. En effet, l'inoculation intrahépatique de ces clones mutants n'induit pas de maladie chez le chimpanzé. De plus, des révertants apparaissent dès le septième jour post-inoculation (Bukh *et al.*, 2002).

#### ***IX- Les « virus-like particles » (VLPs)***

Une autre approche possible pour l'étude des phases précoces du cycle du VHC (attachement et fusion), est le développement d'outils mimant la structure du virion. La fabrication de VLPs en cellules d'insecte a été rapportée pour la première fois en 1998 par Thomas Baumert (Baumert *et al.*, 1998). Dans ce système, les protéines structurales du VHC sont exprimées dans les cellules d'insecte par un baculovirus recombinant. Ces protéines (Core, E1 et E2) s'associent pour former des structures similaires à celles observées dans des biopsies de foie de chimpanzés infectés par le VHC, ainsi que dans des lymphocytes B infectés (Shimizu *et al.*, 1996). La caractérisation biophysique de ces particules a montré qu'elles présentent la même densité en gradient de CsCl que les virions VHC. Enfin, les VLPs sont reconnues par des anticorps anti-VHC.



Depuis leur description, les VLPs produites en cellules d'insecte ont été largement utilisées comme outil de diagnostic (Baumert *et al.*, 2000), dans des essais de vaccination (Lechmann *et al.*, 2001) et dans la recherche des récepteurs cellulaires du VHC (Wellnitz *et al.*, 2002).

D'autres vecteurs que le baculovirus peuvent également être utilisés pour produire des VLPs. Très récemment, Blanchard et collaborateurs ont utilisé le virus de la forêt de Semliki (Semliki Forest Virus, SFV) comme vecteur d'expression des protéines structurales du VHC (Blanchard *et al.*, 2002). Dans ce cas, les VLPs peuvent être produites sur une plus grande variété cellulaire comparé aux VLPs décrits par Baumert *et al.* et les protéines sont exprimées en grande quantité dans les cellules transfectées. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) peut également être utilisé comme vecteur d'expression des protéines de structure du VHC pour la fabrication de VLPs. C'est l'approche qu'ont choisie Ezelle et collaborateurs pour générer des VLPs dont les caractéristiques biochimiques, biophysiques et immunogéniques sont similaires aux virions VHC (Ezelle *et al.*, 2002). Ici, les gènes codant les protéines structurales du VHC ont été clonés dans l'ADNc du génome du VSV. La transfection des cellules BHK-21 par ce plasmide ainsi que par les plasmides codant les autres protéines du VSV a permis l'assemblage des protéines Core, E1 et E2 du VHC en VLPs.

## **X- Les liposomes**

Si les VLPs semblent être un outil attractif pour l'étude des phases précoces du VHC, ces pseudo-particules présentent un inconvénient majeur : elles ne sont pas sécrétées. Par conséquent, elles sont facilement contaminées par des protéines cellulaires lors de leur isolement. Dans le but d'éviter ces problèmes, l'équipe de Dubuisson a intégré

les protéines d'enveloppe du VHC (E1 et E2) dans des vésicules lipidiques de type liposomes (Lambot *et al.*, 2002). La première étape a consisté à purifier les hétérodimères E1 et E2 et de vérifier qu'ils reconnaissent toujours leurs ligands après purification. Les hétérodimères ont ensuite été incorporés dans des liposomes et la correcte orientation des glycoprotéines d'enveloppe a été testée. Le fait que les glycoprotéines E1 et E2 soient correctement repliées et associées dans ce modèle en fait sans doute un outil prometteur.

## ***XI- Les virus chimériques***

Parallèlement aux liposomes et aux VLPs, les virus chimériques représentent un outil intéressant pour l'étude fonctionnelle de l'enveloppe du VHC. Ainsi, Nam et collaborateurs ont construit un génome du virus de la diarrhée bovine (BVDV) dans lequel les gènes de structures du BVDV ont été remplacés par ceux du VHC (Core-E1-E2) (Nam *et al.*, 2001). Le BVDV est un membre de la famille des *Flaviviridae* et appartient au genre pestivirus. Les génomes du BVDV et du VHC présentent une organisation très similaire, ce qui a permis la fabrication de ces virus chimériques. Les auteurs ont montré que le génome chimère était capable de se répliquer à des taux élevés et que les protéines du VHC étaient correctement exprimées. Cependant, ils n'ont pas pu mettre en évidence la production de particules virales portant les protéines de structure du VHC. Plus récemment, le groupe de Rose a décrit des virus VSV recombinants qui expriment les gènes codant les glycoprotéines E1 et E2 du VHC (Buonocore *et al.*, 2002). Dans ce cas, les ectodomaines des glycoprotéines E1 et E2 ont été fusionnés aux domaines transmembranaire et cytoplasmique de la glycoprotéine G du VSV, pour être adressés à la membrane plasmique de la cellule, site de bourgeonnement du VSV. Les gènes codant ces protéines modifiées ont été insérés à la place du gène codant la protéine d'enveloppe du

VSV. Les auteurs ont ainsi pu montrer que les protéines E1 et E2 modifiées étaient correctement incorporées dans les virions. Cependant, les particules ainsi produites n'ont pu infecter ni des hépatocytes primaires humains, ni des cellules HepG2 d'origine hépatique.

Les virus chimériques ont également été utilisés dans des essais vaccinaux chez la souris. Une étude publiée en 2001 rapporte le développement d'un antigène recombinant de l'hépatite B porteur de la séquence immunogénique HVR1 de la glycoprotéine E2 du VHC (Netter *et al.*, 2001). L'injection de cet antigène recombinant chez la souris a induit la production d'anticorps spécifiques de la région HVR1.

Les virus recombinants ont également permis l'étude de la réplication du VHC. Il a ainsi été possible de montrer que la région codant la partie N-terminale de la protéine Core était indispensable au bon fonctionnement de l'IRES du VHC (Lu & Wimmer, 1996). Dans une autre construction, l'IRES du VHC a été remplacé par la région 5' non codante du virus de la fièvre jaune, permettant ainsi une traduction coiffe-dépendante de l'ARN du VHC (Malet *et al.*, 1998). Les résultats obtenus par ce travail ont montré que l'efficacité de la traduction coiffe-dépendante était 5 fois supérieure à la traduction médiée par l'IRES du VHC.

## C- Les pseudotypes

### I- Généralités

Le mécanisme de formation des pseudotypes est un mécanisme naturel. Il a été décrit dès le début des années 70 comme un phénomène de « mélange de phénotypes ». Le mélange des phénotypes peut être fréquemment observé lorsqu'une cellule est infectée simultanément par deux virus enveloppés. Les virions obtenus suite à cette double infection possèdent le génome et les protéines internes d'un des deux virus et sont enveloppés par un mélange des glycoprotéines des deux virus. Ces virions sont appelés pseudotypes. Dans ce cas, les pseudotypes présentent une enveloppe mixte. L'obtention de pseudotypes « purs », possédant une enveloppe unique requiert l'utilisation de virus mutants déficients dans la synthèse ou le transport des glycoprotéines (Zavada, 1982). Les virus pseudotypes n'étant pas génétiquement modifiés, ils redonnent naissance aux virus parentaux lors d'une infection.

Depuis la découverte et la compréhension de ce mécanisme, les virus pseudotypes ont été largement utilisés dans la recherche. En effet, la fabrication de tels virus a permis l'étude d'agents dont la manipulation est délicate en raison de leur pathogénicité ou de l'absence de système de culture adéquat. Les virus pseudotypes obtenus rendent possible la compréhension des phases précoces de l'infection, i.e. la fixation au récepteur et la fusion. Leurs génomes n'étant pas modifiés, il est donc impossible d'utiliser ces virus pour l'étude des mécanismes de réplication.

Ce système a été utilisé pour l'analyse de la glycoprotéine du virus Ebola (Takada *et al.*, 1997). Dans cette étude, un virus de la stomatite vésiculaire (VSV) dont le gène

codant la glycoprotéine G d'enveloppe a été remplacé par celui codant la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein GFP) a été utilisé. Ce virus ne peut être infectieux que lorsqu'une protéine d'enveloppe responsable de la fixation au récepteur et de la fusion est apportée en *trans*. Ici, la délétion de la glycoprotéine G est complétée par la protéine d'enveloppe du virus Ebola. Les auteurs ont ainsi pu fabriquer un outil permettant la recherche des récepteurs cellulaires et de leurs cofacteurs du virus Ebola, et ce, en réduisant le risque biologique lié à la manipulation de ce virus.

Le virus de la rougeole représente également un bon exemple de l'utilisation des pseudotypes. Tatsuo et collaborateurs (Tatsuo *et al.*, 2000) ont ainsi pu réaliser une étude sur la différence de tropisme entre plusieurs souches du virus de la rougeole et montrer que le pouvoir infectieux de la souche était parfaitement corrélé avec l'efficacité de pénétration du pseudotype.

Les pseudotypes ont largement été utilisés pour l'étude du VIH. Il a notamment été possible d'étudier le rôle de la protéine Nef dans le cycle viral (Aiken, 1997), ainsi que le rôle des protéines d'enveloppe du HIV-1 dans l'infection (Johnson *et al.*, 1997, Boritz *et al.*, 1999).

De nombreux autres exemples concernant l'utilisation des pseudotypes peuvent être cités. A l'heure actuelle, plusieurs techniques sont utilisées pour produire des virus pseudotypes mais elles sont toutes basées sur le même principe : incorporer les glycoprotéines d'enveloppe du virus à étudier en complétant une mutation ou une délétion du virus « hôte ». Le virus hôte doit présenter plusieurs propriétés telles qu'une faible pathogénicité pour l'homme afin d'être manipulé aisément, doit pouvoir se multiplier à haut titre et bien sûr, doit être capable d'intégrer une enveloppe autre que la sienne. C'est pour ces raisons que le VSV est un support idéal pour la production de virus pseudotypes.

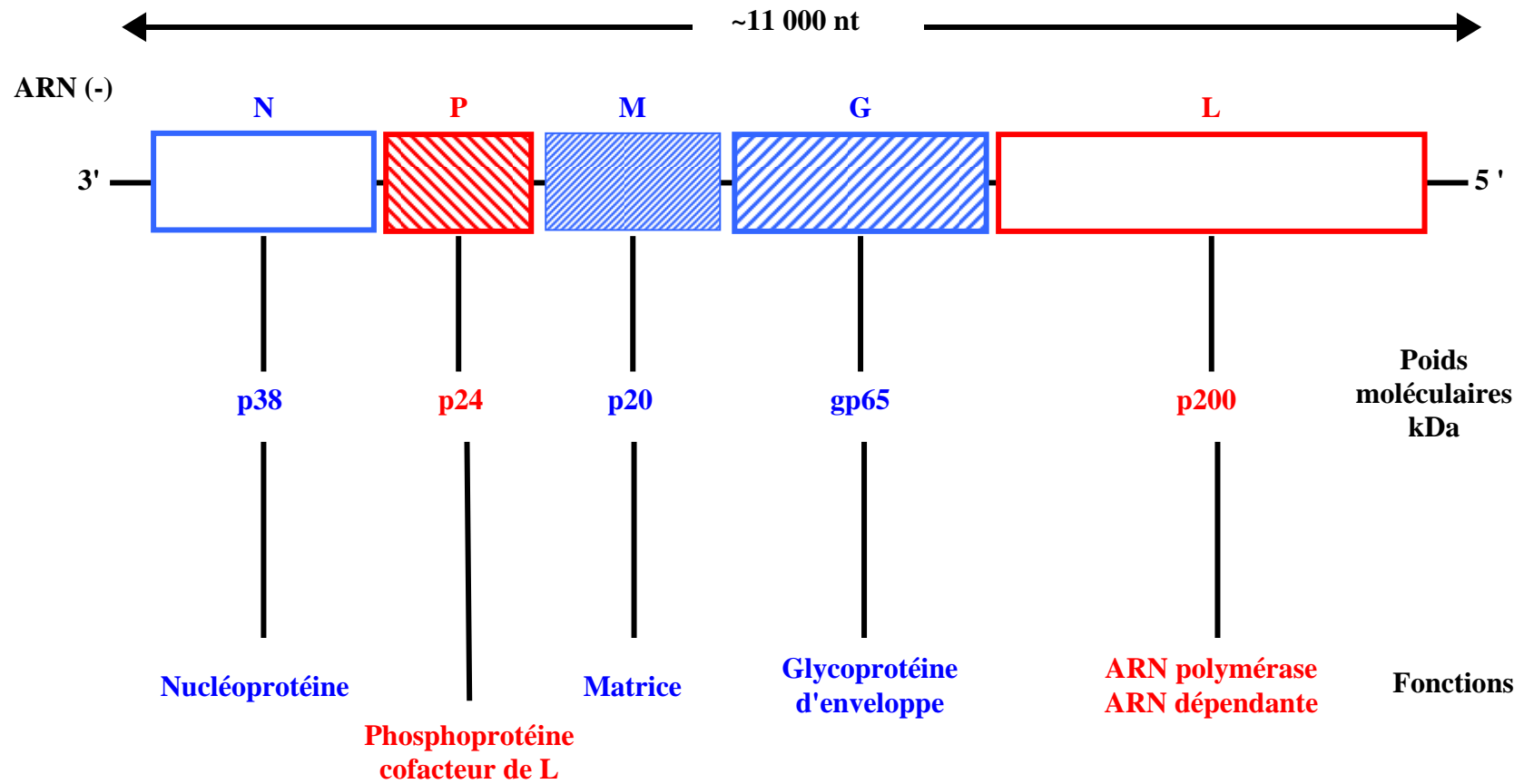
## **II- Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)**

### **1. Généralités**

Le VSV appartient à la famille des *Rhabdoviridae*, genre vésiculovirus. Ce virus infecte principalement le bétail chez qui la maladie se manifeste par la présence de vésicules et d'ulcérations sur la langue, les muqueuses orales, les dents et les sabots. Les signes cliniques lors de l'infection par le VSV sont impossibles à distinguer de ceux provoqués par la fièvre aphteuse, sauf chez les chevaux. Cependant, au contraire de la fièvre aphteuse, le VSV est très contagieux pour l'homme chez qui l'infection peut être asymptomatique ou provoquer de légers symptômes grippaux, des lésions buccales de type Herpès, des maux de tête, un état de malaise général, une myalgie, des nausées... Le traitement est symptomatique et aucun cas de mortalité due au VSV n'a été rapporté (Dietzschold *et al.*, 1996, Letchworth *et al.*, 1999).

### **2. Structure des virions et du génome**

Le VSV a une forme d'obus d'une longueur d'environ 200 nm et d'une largeur d'environ 70 nm. Son enveloppe est constituée d'une seule glycoprotéine (G) assemblée en trimères qui forment les spicules. La nucléoprotéine est organisée en hélice. Son génome est un ARN polycistronique de polarité négative d'une longueur d'environ 11 kb. Il code 5 protéines : la glycoprotéine d'enveloppe G (65 kDa), la protéine de matrice M (20 kDa), l'ARN polymérase ARN dépendante L (200 kDa), la phosphoprotéine P (24 kDa) et la nucléoprotéine N (38 kDa) (Fig. 5).

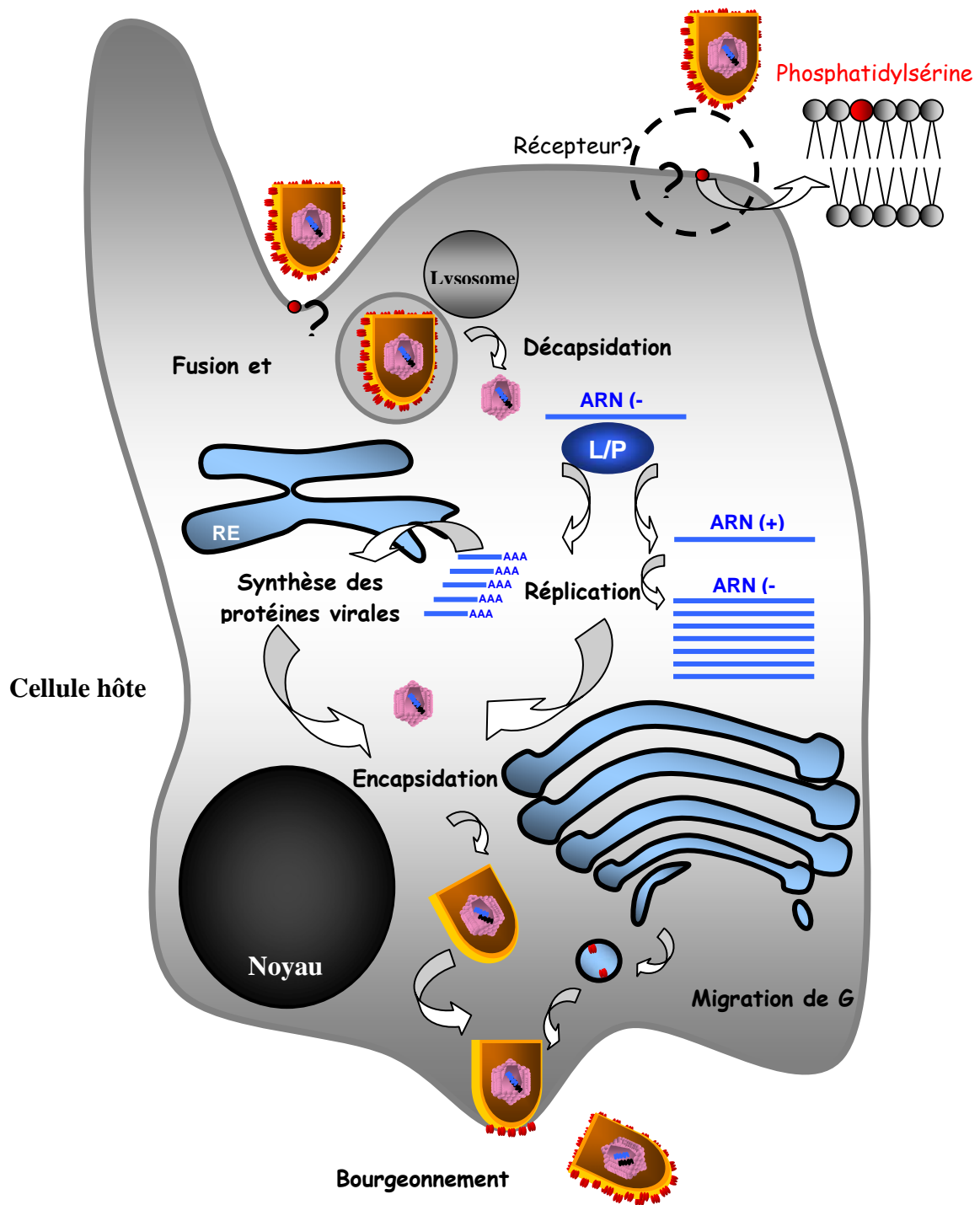


**Figure 5** : Organisation génomique du VSV

### 3. Cycle répliatif (Fig. 6)

Le VSV est capable d'infecter un large spectre de cellules. Son récepteur n'a pas été identifié mais il est connu qu'il se lie aux phosphatidylsérines présentes à la surface cellulaire. Cette fixation entraîne son internalisation et la fusion à l'endosome. A pH acide, la glycoprotéine d'enveloppe change de conformation et sa partie transmembranaire s'ancre dans la membrane de l'endosome. La nucléocapside est ensuite libérée dans le cytoplasme de la cellule, ainsi que les protéines virales présentes dans le virion (Letchworth *et al.*, 1999). La première étape de la réplication virale consiste à fabriquer des ARNm. Chaque cistron est ponctué par un signal de polyadénylation et par un signal d'initiation du cistron suivant. Par conséquent, chaque cistron est transcrit à un niveau inférieur par rapport à celui qui le précède (Schnell *et al.*, 1996). Les 5 ARNm ainsi obtenus sont immédiatement traduits en protéines. A partir d'un certain seuil d'accumulation de protéines virales, l'ARN polymérase cesse de synthétiser des ARNm pour fabriquer des ARN positifs « pleine longueur » qui servent de matrice à la réplication du brin génomique de polarité négative. La présence d'une séquence signal à l'extrémité de l'ARN va déclencher la formation d'une gaine par la protéine N néosynthétisée. Les protéines L et P vont aussi se lier à l'ARN par l'intermédiaire de la protéine N et former les nucléocapsides. La protéine M est capable d'interagir avec la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un domaine N-terminal hydrophobe et avec les nucléocapsides qu'elle va entourer et auxquelles elle donne la forme d'obus. La protéine G quant à elle est associée en trimères et migre à la membrane cellulaire où a lieu le bourgeonnement du VSV.





**Figure 6** : Cycle réplcatif du virus de la stomatite vésiculaire.

#### 4. VSV thermosensible *tsO45*

Cette souche mutante du VSV a été décrite pour la première fois en 1970 (Flamand, 1970). Le génome du VSV<sub>*tsO45*</sub> est porteur d'une seule mutation dans le gène codant la glycoprotéine G d'enveloppe (Gallione & Rose, 1985). A la température non permissive de 40,5 °C, la maturation de la protéine G est anormale, ce qui provoque sa rétention dans le réticulum endoplasmique (Bergmann *et al.*, 1981). Ceci a pour conséquence la production de particules non enveloppées donc non infectieuses (Schnitzer *et al.*, 1979).

### ***III- Production de virus pseudotypes***

#### 1. Généralités

L'obtention de virus pseudotypes est basée sur le principe suivant : il s'agit de compléter une mutation ou une délétion du virus hôte en apportant la ou les glycoprotéine(s) d'intérêt en *trans*. Le virus hôte le plus couramment utilisé est le VSV pour les raisons décrites précédemment. La souche VSV qui sera utilisée pour produire des pseudotypes ne doit pas exprimer sa glycoprotéine G correctement. Les auteurs utilisant ce type de virus choisissent donc soit un VSV qui est délété du gène exprimant la glycoprotéine G, soit une souche thermosensible (*tsO45*) dont l'utilisation à la température non-permissive bloquera la migration de G à la surface de la cellule. Les glycoprotéines d'intérêt sont apportées en *trans* et doivent être localisées à la membrane plasmique de la cellule, site de bourgeonnement du VSV. Plusieurs vecteurs exprimant ces protéines ont été décrits. Ainsi, le groupe de Ray (Lagging *et al.*, 1998) transfecte des cellules BHK-21

par un plasmide dans lequel les gènes codant les glycoprotéines du VHC sont placés sous contrôle d'un promoteur T7. Ces cellules sont ensuite infectées par un virus de la vaccine recombinant qui exprime la polymérase T7. Finalement, une sur-infection par le VSV<sub>tsO45</sub> permet la production de particules pseudotypes. Ce système présente cependant un inconvénient majeur : le virus de la vaccine utilisé pour exprimer la polymérase T7 est un virus répliatif. La production de pseudotypes est donc contaminée par des virions vaccine et doit être traitée soit par des anticorps neutralisant la vaccine, soit par passage sur filtre de 0,1 µm. Ces traitements ont pour conséquence un titre infectieux diminué des pseudotypes. L'approche développée par Matsuura et collaborateurs (Matsuura *et al.*, 2001) consiste à utiliser un VSV dont le gène codant la glycoprotéine d'enveloppe a été remplacé par celui codant la GFP. Cette technique permet une détection aisée des particules. Cependant, la propagation du VSVΔG est réalisée par passage sur des cellules exprimant la glycoprotéine G. Ceci pourrait avoir pour conséquence la présence de protéine G résiduelle sur les particules (Buonocore *et al.*, 2002).

## 2. Modification des protéines d'enveloppe du VHC

Pour produire des virus pseudotypes, les protéines d'enveloppe d'intérêt doivent être exprimées à la membrane de la cellule qui est le site de bourgeonnement du VSV. Les glycoprotéines E1 et E2 du VHC étant retenues au niveau du RE, elles doivent subir des modifications afin d'être délocalisées. Des études ont été menées sur la caractérisation des formes tronquées de E1 et E2. Il a ainsi été montré que la protéine E1 tronquée à l'acide aminé 311 et la protéine E2 tronquée à l'acide aminé 661 étaient efficacement secrétées. De plus, la forme E2<sub>661</sub> semble être correctement repliée (Michalak *et al.*, 1997) et conserve ses propriétés de liaison au CD81 (Flint *et al.*, 2000). La fusion des formes

tronquées de E1 et E2 au domaine transmembranaire et à la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G du VSV permet l'ancrage de ces deux protéines à la surface de la cellule, ainsi que leur incorporation dans les virus pseudotypes (Lagging *et al.*, 1998).

### 3. Expression des glycoprotéines modifiées du VHC dans la cellule hôte

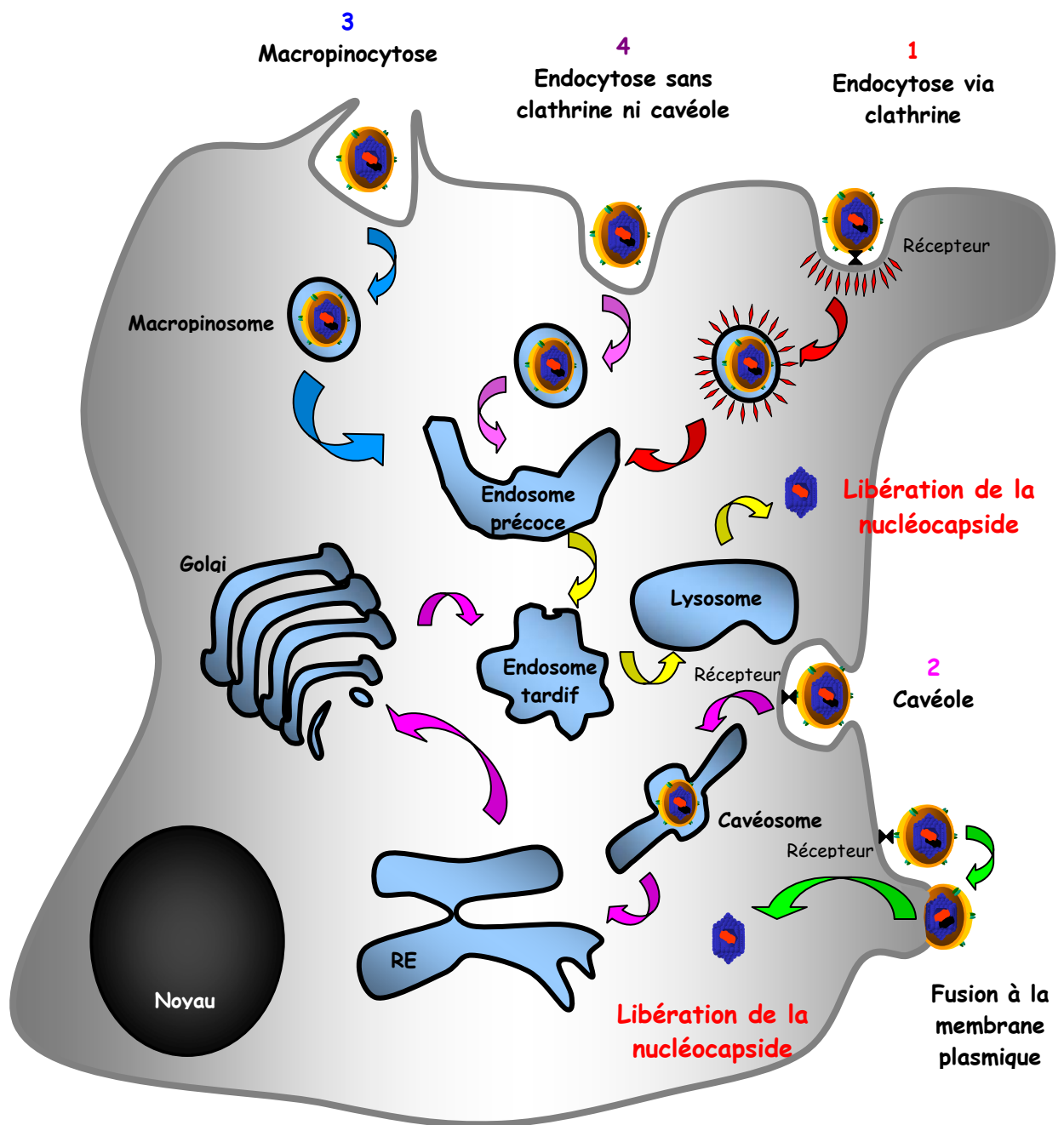
Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 1, différentes techniques peuvent être utilisées pour exprimer les glycoprotéines d'intérêt lors de la production de pseudotypes. Nous avons décrit les problèmes inhérents à l'utilisation du système utilisant le promoteur T7. Il faut également noter qu'un tel système d'expression provoque la formation d'agrégats de E1 et E2 associées par des liaisons disulfures anormales (Grakoui *et al.*, 1993, Dubuisson *et al.*, 1994). La formation de tels agrégats serait la conséquence d'une voie de synthèse non productive dans le cycle de réplication du virus (Dubuisson, 2000). En 1998, Seong et collaborateurs (Seong *et al.*, 1998) ont décrit la construction d'un adénovirus recombinant exprimant les glycoprotéines du VHC. D'après les auteurs, ce système d'expression permet de diminuer la quantité d'agrégats formés, en comparaison avec des vecteurs d'expression tels qu'un virus de la vaccine ou un virus Sindbis recombinants.

## D- Pénétration du VHC dans la cellule hôte

### I- Généralités

Les virus étant des parasites intracellulaires obligatoires, ils ont développé des stratégies d'entrée dans la cellule afin de se répliquer. Il existe deux voies principales d'entrée du virus enveloppé dans une cellule animale : (i) par un mécanisme de fusion directe à la surface de la cellule ou (ii) par internalisation dans les compartiments cellulaires, tel l'endosome dans le cas d'une entrée par endocytose, l'internalisation en elle-même n'étant généralement pas suffisante pour induire une infection productive. Par conséquent, pour libérer leur nucléocapside, les virus doivent fusionner leur membrane à celle de l'endosome. De plus, la voie de l'endocytose est souvent un moyen pour le virus d'être localisé dans la cellule à l'endroit le mieux adapté à sa multiplication.

De nombreuses familles de virus utilisent l'endocytose médiée par un récepteur spécifique comme voie d'entrée dans la cellule. C'est notamment le cas des *Flaviviridae* dont le VHC fait partie. Une des voies d'internalisation la mieux connue est l'endocytose dépendante de la clathrine (revue Brodsky *et al.*, 2001). En réponse à un signal d'internalisation, la clathrine s'assemble sur la face interne de la membrane plasmique et forme une invagination caractéristique facilement identifiable lors d'une observation en microscopie électronique à transmission. D'autres voies ont été décrites depuis parmi lesquelles une voie utilisant la cavéole, une voie d'entrée par macropinocytose et une voie qui ne dépend ni de la clathrine, ni de la cavéole. Ces différents mode d'endocytose sont résumés en figure 7. L'endosome précoce est une structure vésiculaire et tubulaire à partir de laquelle la particule internalisée peut soit être délivrée à la membrane plasmique, soit



**Figure 7 :** Les différents modes d'entrée du virus dans la cellule hôte.

évoluer vers l'endosome tardif. Il est admis que l'endosome tardif, qui est localisé à proximité du noyau, présente une structure plus sphérique que l'endosome précoce et qu'il peut contenir des vésicules internes. Le pH de l'endosome tardif est également plus acide que celui de l'endosome précoce (5,5 contre 6,2-6,5). L'endosome tardif progresse ensuite vers le lysosome qui est caractérisé par la présence de protéases et d'hydrolases.

## **II- Voies de pénétration dans la cellule**

### **1. Endocytose clathrine-dépendante**

Il a été montré que suite à la reconnaissance d'un récepteur spécifique, de nombreux virus utilisent cette voie pour pénétrer dans la cellule. Parmi les virus les plus étudiés, se trouvent les orthomyxovirus (le virus de la grippe), les rhabdovirus (le virus de la stomatite vésiculaire), les alphavirus (le virus de la forêt de Semliki) et les adénovirus qui sont non-enveloppés. Ces virus ont pu être observés à l'intérieur de vésicules tapissées de clathrine, appelées vésicules épineuses (Marsh & Helenius, 1980, Matlin *et al.*, 1981, 1982). La voie de la clathrine peut être inhibée de trois façons différentes : par un choc de pH, par déplétion des ions potassium, ou par l'utilisation de drogues telles que la bréfeldine A (BFA) qui cible les GTPases de la voie de sécrétion ou la chlorpromazine, un antagoniste de la calmoduline. En effet, il a été montré que la calmoduline intervient dans la formation des vésicules épineuses (Salisbury *et al.*, 1980).

## 2. Cavéole

Une autre voie décrite récemment est l'endocytose dépendante de la cavéole. Les cavéoles sont des invaginations sphériques de la membrane plasmique auxquelles sont associées des vésicules. Elles contiennent des protéines intégralement membranaires (les cavéolines) associées en hétérotrimères. Les cavéoles sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides. En plus de leur participation dans l'endocytose, de nombreux rôles physiologiques sont associés aux cavéoles. En effet, les cavéoles sont des zones qui regroupent de fortes concentrations en récepteurs, notamment ceux de l'EGF (epidermal growth factor), du PDGF (platelet-derived growth factor) et de l'insuline. De plus, de nombreuses protéines de signalisation appartenant à la famille des protéines kinases entre autres, sont localisées au niveau des ces sites (Shin & Abraham, 2001). Les cavéoles joueraient également un rôle dans le transport des lipides néo-synthétisés (Fielding & Fielding, 2001).

A l'heure actuelle, ce mode d'entrée a été montré de façon formelle, uniquement pour le virus simien 40 (SV40) (Norkin, 1999, Parton & Lindsay, 1999). L'internalisation par les cavéoles est plus lente que par la clathrine et ne se déroule qu'après stimulation de la cellule (Thomsen *et al.*, 2002).

De nombreuses drogues peuvent être utilisées pour interrompre cette voie d'entrée mais les plus efficaces sont celles qui sont capables de séquestrer le cholestérol, telles la nystatine, la filipine ou la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (Rothberg *et al.*, 1992, Neufeld *et al.*, 1996, Orlandi & Fishman, 1998). En effet, le cholestérol est un élément majoritaire des radeaux lipidiques qui sont impliqués dans la formation des cavéoles.



### 3. Macropinocytose

La macropinocytose, comme la phagocytose est généralement considérée comme un mécanisme d'internalisation non spécifique car elle ne dépend pas de la fixation à un récepteur. Après stimulation de la cellule, des lamellipodes se développent au niveau de la perturbation de la membrane puis se referment, formant ainsi de larges vésicules irrégulières appelées macropinosomes. La formation des lamellipodes est dépendante de l'actine et les macropinosomes peuvent s'acidifier et agir comme des vésicules d'endocytose (Hewlett *et al.*, 1994). L'actine étant un élément indispensable à la macropinocytose, elle constitue une cible privilégiée pour les inhibiteurs de macropinocytose. Les inhibiteurs les plus couramment utilisés appartiennent à la famille des cytochalasines (Maniak, 2001), connus pour bloquer la polymérisation des filaments d'actine.

Les inhibiteurs de ces différentes voies sont résumés Table I.

Voie	Inhibiteurs	Cibles
Clathrine-dépendante	Bréfeldine A (BFA)	Inhibe les GTPases de la voie de signalisation
	Chlorpromazine	Antagoniste de la calmoduline
Cavéole-dépendante	Nystatine	Chélateurs de cholestérol
	Filipine	
	Méthyl-beta-cyclodextrine (MBCD)	
Macropinocytose	Cytochalasines	Destabilisent les microfilaments d'actine

**Table 1** : Principales voie d'endocytose et leurs inhibiteurs.

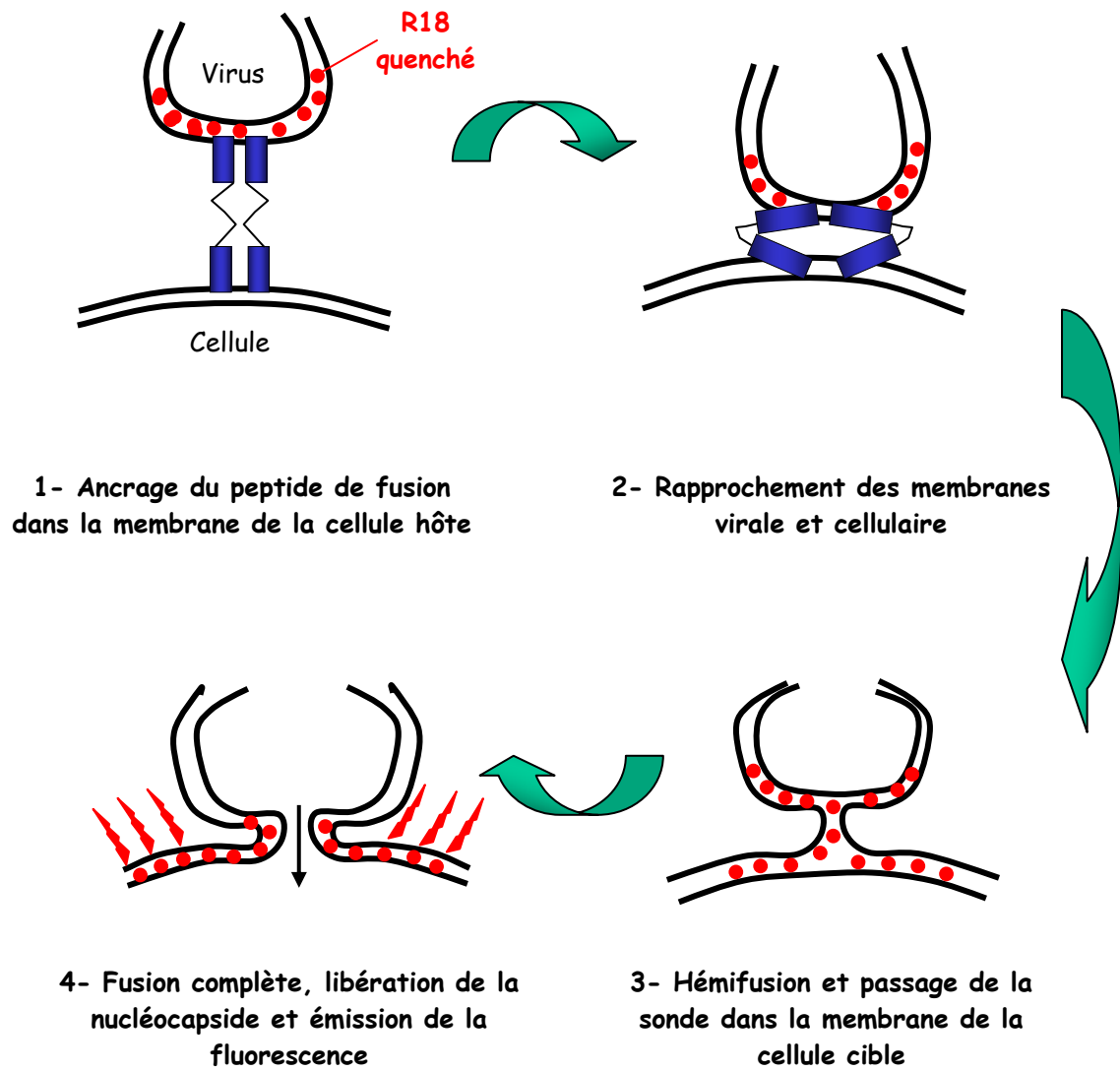
#### 4. Voie sans clathrine ni cavéole

Parallèlement aux voies de pénétration bien définies utilisant la clathrine ou la cavéole dans les cellules stimulées, il existe une voie de pénétration alternative mal définie, indépendante de la clathrine et de la cavéole dans les cellules quiescentes (Bishop, 1997, Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001).

Le récepteur de l'Il-2 est un des marqueurs les plus étudiés pour l'utilisation de cette voie. Dans des cellules dépourvues de cavéole, l'internalisation et la libération de ce récepteur dans l'endosome tardif et dans le lysosome sont indépendantes de la clathrine. Il a été montré que ce mécanisme requiert la présence de dynamine (famille de GTPases) (Lamaze *et al.*, 2001). Cependant, un tel mécanisme peut exister dans la cellule en même temps qu'un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante (Puri *et al.*, 2001).

### ***III- Mécanisme de la fusion des virus***

La fusion de l'enveloppe virale et des membranes cellulaires est une étape essentielle lors de la pénétration du virus dans la cellule hôte. Ce processus implique des protéines virales spécifiques telles l'hémagglutinine pour l'influenza, la protéine Env du VIH ou la protéine de fusion F des paramyxovirus. Les protéines de fusion des virus enveloppés sont des protéines membranaires de type I codées par le virus (revue : Eckert & Kim, 2001). Elles sont incorporées dans l'enveloppe du virus lors du bourgeonnement. Elles comportent une séquence signal N-terminale responsable de leur localisation dans le RE et qui peut être clivée, un ectodomaine large, une région transmembranaire sous forme d'hélice qui permet l'ancrage dans la membrane cellulaire et une queue cytoplasmique. Ces protéines contiennent également une courte région, appelée « peptide de fusion », qui



**Figure 8** : Mécanisme de la fusion virale, principe du marquage au R18.

est indispensable à la fusion des membranes virale et cellulaire. Le peptide de fusion est généralement riche en résidus hydrophobes et en glycine. Il interagit avec la membrane cellulaire dans la phase précoce du mécanisme de fusion.

Suite à la fixation, certains virus fusionnent à la membrane cellulaire à pH neutre, alors que d'autres pénètrent par endocytose et ne fusionnent qu'à pH acide. Dans les deux cas, les protéines de fusion virales subissent une série de changements conformationnels afin d'initier la fusion avec la cellule. Ces changements de conformation se produisent soit en réponse à la fixation au récepteur (comme c'est le cas pour la protéine Env du VIH), soit suite à une exposition à un pH acide (dans le cas de l'hémagglutinine de l'influenza) et permettent l'exposition du peptide de fusion qui va ainsi être capable d'aller s'insérer dans la membrane cellulaire. La suite du processus implique un rapprochement des membranes cellulaire et virale, puis la formation d'un pore, et finalement la libération de la nucléocapside dans la cellule hôte (Fig. 8).

Pour conclure brièvement, les virus peuvent être séparés en deux grandes catégories : les virus pH-dépendants qui pénètrent dans la cellule par endocytose, et les virus pH-indépendants qui pénètrent dans la cellule par fusion directe à la membrane plasmique. Cependant, la distinction n'est pas aussi nette qu'il y paraît puisque les virus dit pH-indépendants peuvent également entrer dans la cellule à pH acide et leur capture par des vésicules d'endocytose n'empêche pas leur libération dans le cytoplasme. Le virus d'Epstein-Barr est un excellent exemple de l'utilisation de ce double mode d'entrée dans la cellule (Miller & Hutt-Fletcher, 1992).

#### ***IV- VHC et fusion***

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur le mode d'entrée du VHC dans la cellule hôte. Récemment, l'équipe de Miyamura a développé un test de fusion dans lequel les protéines d'enveloppe du VHC sont exprimées à la surface de cellules de hamster CHO (Takikawa *et al.*, 2000). Dans ce cas, la fusion est mesurée par l'activation d'un gène reporter. Cette étude a permis de montrer que l'activité de fusion de E1 et E2 était augmentée suite à un traitement à pH acide. Ces résultats suggèrent que le VHC pénètre dans la cellule par la voie de l'endosome au niveau duquel E1 et/ou E2 subissent des modifications conformationnelles provoquant la fusion des membranes cellulaire et virale, puis la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. Ces observations ont été confirmées par l'utilisation de virus pseudotypes. L'équipe de Ray a montré que l'infection par les pseudotypes VSV/VHC était diminuée suite à un traitement des cellules par des inhibiteurs de la H<sup>+</sup>-ATPase (responsable de l'acidification de l'endosome), ce qui suggère que l'entrée du virus se fait par une voie pH-dépendante (Meyer *et al.*, 2000).

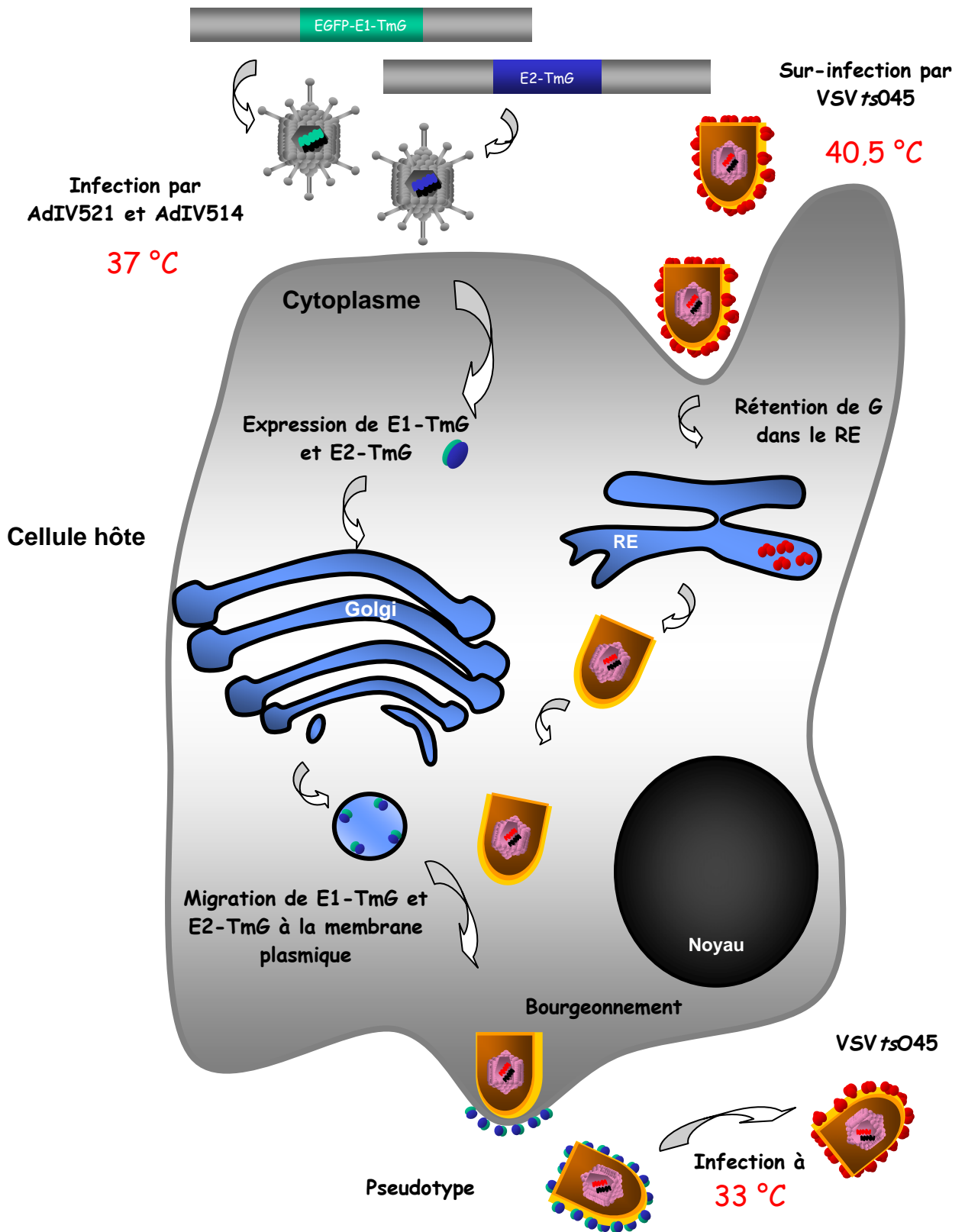
# *A*vant-propos

## Avant-propos

En raison de l'absence de système de culture cellulaire capable de propager efficacement le virus de l'hépatite C, peu de données sont disponibles concernant les phases précoces de l'infection. Afin d'étudier la fusion et la pénétration du VHC dans la cellule hôte, nous avons choisi de fabriquer des virus pseudotypes VSV/VHC destinés à mimer l'enveloppe du VHC dans les phases précoces de l'infection.

Dans un premier temps, les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (E1 et E2) sont modifiées pour être localisées à la membrane plasmique, site de bourgeonnement du VSV. Pour cela, les ectodomains de E1 et de E2 sont fusionnés aux domaines transmembranaire et cytoplasmique de la glycoprotéine G du VSV. Ces protéines chimériques sont exprimées dans la cellule grâce à deux adénovirus recombinants non réplicatifs. Pour produire les virus pseudotypes, les cellules sont tout d'abord infectées par ces deux adénovirus recombinants à 37 °C, puis par le VSV<sub>tsO45</sub> à 40,5 °C, température à laquelle la glycoprotéine G mutée est retenue au niveau du réticulum endoplasmique (Fig. 9). Les particules ainsi produites sont constituées d'une enveloppe contenant les glycoprotéines E1 et E2 modifiées et leur génome est celui du VSV<sub>tsO45</sub>. Par conséquent, l'infection de cellules par les pseudotypes à 33 °C (température permissive de la mutation thermosensible) permet la production de VSV<sub>tsO45</sub>. L'approche que nous avons utilisée pour produire nos virus pseudotypes est détaillée dans la **publication n°1**.

Dans un deuxième temps, nous nous intéressons aux mécanismes utilisés par le VHC pour pénétrer dans la cellule. Les pseudotypes nous servent ainsi à déterminer le pH optimal requis pour la fusion des membranes cellulaire et virale et nous permettent d'élucider une partie des mécanismes d'endocytose mis en jeu lors de l'infection par le VHC. Les méthodologies utilisées et les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans la **publication n°2**.



**Figure 9** : Obtention de virus pseudotypes VSV/VHC



Publication n°1

(article en préparation)

# Publication n°1

**Use of non-replicative recombinant adenoviruses as a novel approach to generate pure and reproducible VSV/HCV pseudotyped particles.**

Audrey Codran<sup>1</sup>, Cathy Royer<sup>1</sup>, Daniel Jaeck<sup>2</sup>, Michèle Bastien-Valle<sup>1</sup>, Marie Paule Kieny<sup>1</sup>, Jean-Pierre Martin<sup>1</sup>

1: Inserm U544, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67 000 Strasbourg, France

2: Centre de Chirurgie Viscérale et de Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Haute-pierre, 67 000 Strasbourg, France

(Manuscrit en préparation)

## Summary

Hepatitis C virus (HCV) is the leading cause of world-wide liver disease, but its study is greatly impaired by the lack of an efficient cell culture system to propagate HCV. Vesicular stomatitis virus (VSV)/HCV pseudotyped particles have been generated in order to mimic HCV virions during the early stages of the viral cycle. In this study, we have developed a new method to produce VSV/HCV pseudotyped particles. Truncated E1 (amino acid 311) and E2 (amino acid 661) were fused to the transmembrane domain and the cytoplasmic tail of VSV G glycoprotein, in order to be localised at the plasma membrane, the budding site of VSV, as verified by flow cytometry. Complementation of a temperature sensitive strain of VSV (*tsO45*) by two defective recombinant adenoviruses expressing modified E1 and E2 glycoproteins, at the non permissive temperature of 40.5 °C, allowed us to produce VSV/HCV pseudotypes, without any modification of the VSV genome. Infectivity of these particles have been tested on primary human hepatocytes and on two human hepatic cell lines (Huh-7 and HepG2). By using neutralising antibodies specific to VSV G glycoprotein, we have shown that pseudotypes bear an envelop which is constituted of HCV E1 and E2 glycoproteins that are responsible for viral entry into cells. In this study, we have developed a novel approach to produce VSV/HCV pseudotypes. This method ensure a high level of production of non-contaminated pseudotypes.

## Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the major etiological agent of parenterally transmitted non-A non-B hepatitis (Houghton *et al.*, 1991). HCV infection becomes chronic in most cases and eventually results in the development of cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Furthermore, neither a vaccine nor a completely effective therapy is available as yet to control HCV infection.

HCV is a positive strand RNA virus which belongs to the *Flaviviridae* family. Its genome encodes a single precursor polyprotein, which is processed into functional proteins by viral and cellular peptidases to yield structural and non-structural proteins. The structural proteins - core, two envelope glycoproteins named E1 and E2 and the short hydrophobic p7 polypeptide - are located at the N-terminus of the polyprotein (Clarke, 1997).

In cultured cells, it was demonstrated that recombinant E1 and E2 interact together to form a non-covalent heterodimer. These two glycoproteins essentially localise in the endoplasmic reticulum (ER) (Lanford *et al.*, 1993, Dubuisson *et al.*, 1994, Deleersnyder *et al.*, 1997), where HCV budding is thought to occur. E1 and E2 proteins are essential determinants for entry of viral particles into cells (Flint & McKeating, 2000). *In vitro*, the envelope glycoprotein E2 was shown to specifically bind to human CD81 (Pileri *et al.*, 1998, Flint *et al.*, 1999) and to interact with the cellular low-density lipoprotein receptor (Thomssen *et al.*, 1992, Wunschmann *et al.*, 2000). A short hydrophobic stretch of amino acids of E1 may be implicated in membrane fusion (Flint & McKeating, 1999, Takikawa *et al.*, 2000). *In vivo*, both infected patients and chimpanzees immunised with recombinant E1 and E2 proteins develop in their sera neutralising antibodies which can prevent viral infection in cell culture (Zibert *et al.*, 1995, Shimizu *et al.*, 1996, Fournillier *et al.*, 1999).

The lack of an efficient cell culture system to replicate HCV has hampered the study of the cellular biology of this virus. To overcome this difficulty, we and others have attempted to produce pseudotyped which integrate HCV envelope proteins on their surface, allowing investigation of virus-host cell membrane interactions.

Vesicular stomatitis virus (VSV) is the prototype of rhabdoviruses. It infects and replicates in a large range of mammalian cells and its envelope consists of only one spike glycoprotein (G). The *tsO45* temperature-sensitive mutant of VSV is characterised by a single amino acid substitution in the ectodomain of the G glycoprotein, leading to misfolding and aggregation of the glycoprotein at 40,5 °C (Whitt *et al.*, 1989). Retention of G in the ER results in the production and budding of non infectious VSV particles (Flamand & Bishop, 1973, Schnitzer *et al.*, 1979, Gallione & Rose, 1985).

Phenotypic mixing (Zavada, 1982) and incorporation of foreign glycoproteins into VSV envelope have been used to facilitate the study of a number of viral glycoproteins (Pauza, 1991, Owens & Rose, 1993, Schnell *et al.*, 1996, Ito *et al.*, 2001). Notably, various methods have been developed to produce HCV/VSV pseudotyped particles. The first generation of pseudotypes was produced by co-infecting cells with VSV<sub>*tsO45*</sub> and a recombinant vaccinia virus expressing the T7 polymerase, followed by transfection of plasmids encoding under the control of a T7 promoter E1 or E2 proteins modified to localise at the plasma membrane (Lagging *et al.*, 1998, Meyer *et al.*, 2000). Pseudotyped particles have also been generated from stable cell lines expressing HCV E1 and/or E2 and infected with a recombinant non infectious VSV expressing the green fluorescent protein (EGFP) gene in place of the glycoprotein G gene (Matsuura *et al.*, 2001).

Envelope glycoproteins play a critical role in first steps of viral infection, as they are responsible for binding of particles to target cells and induction of membrane fusion. Moreover, they are involved in the budding process. Therefore, HCV E1 and E2

glycoproteins have been extensively studied. Cocquerel *et al.* (Cocquerel *et al.*, 1998) have generated chimeric proteins in which specific E2 domains were exchanged for corresponding domains of proteins normally transported to the plasma membrane. The results obtained demonstrate that the transmembrane domain of E2 (29 amino acids at the C-terminal extremity) is sufficient to direct retention of E2 in the ER compartment. The same method was used to examine E1 localisation and likewise demonstrated that E1 transmembrane domain was responsible for retention of this protein in the ER (Cocquerel *et al.*, 1999, Flint & McKeating, 1999).

In order to produce VSV pseudotypes in which E1 and E2 would be expressed instead of G at the plasma membrane, the natural budding site of rhabdoviruses, we first modified the intracellular trafficking of these two glycoproteins. For this purpose, we generated defective recombinant adenoviruses which express chimeric genes encoding chimeric proteins consisting of the E1 or E2 ectodomains fused with the transmembrane domain and intracytoplasmic region of the VSV G glycoprotein (TmG). Utilisation of recombinant defective adenoviruses offers many advantages: adenovirus grows to high titres in adapted cell culture systems, its DNA genome is stable and the introduction of a CMV promoter upstream of the transgene allows high level expression of recombinant proteins (Stephenson, 1998). Lastly and importantly, infection with a defective recombinant virus of non permissive cells does not result in production of adenoviral particles, on the contrary of what is obtained with a recombinant vaccinia virus, which generates high amounts of poxviral particles.

For this purpose, we have produced VSV/HCV pseudotyped particles by *in vitro* triple infection of cells with two recombinant adenoviruses expressing E1 or E2, and with the VSV *ts* mutant at a non-permissive temperature. We have characterised the VSV/E1TmG-E2TmG HCV pseudotypes, their resistance to neutralisation by antibodies

directed against the G protein and their capacity to infect and replicate in human cell lines from hepatic origin (HepG2 and Huh7) and in primary human hepatocytes.

## **Materials and methods**

### Cell lines

Baby hamster kidney cells (BHK-21, reference CCL-10), HepG2 human hepatoma cells (reference HB-8065) and 293 human embryonic kidney cells (reference CRL-1573) were obtained from the American Type Culture Collection. The human hepatoma cell line Huh-7 was kindly provided by R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Dept of Molecular Biology, Heidelberg, Germ.). BHK-21 cells were maintained in Glasgow medium (GMEM, Invitrogen) supplemented with 5 % foetal calf serum (FCS, Invitrogen), 10 % tryptose phosphate broth and gentamycin (50 µg/ml). HEK 293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10 % FCS, 1 X glutamax (Invitrogen) and gentamycin (50 µg/ml). HepG2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS, 1 mM sodium pyruvate and gentamycin (50 µg/ml). Huh-7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS, 1 X glutamax, 1 mM sodium pyruvate, 1 X non essential amino acids (Invitrogen) and gentamycin (50 µg/ml).

### Human hepatocytes isolation

Primary human hepatocytes were prepared as described elsewhere (David *et al.*, 1998). Briefly, liver resection samples were obtained in agreement with the local Ethics Committee from patients undergoing partial hepatectomy for a metastatic liver tumour (Centre de Chirurgie Viscérale et de Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Hautepierre, Strasbourg, Fr.). The liver sample was perfused first with Ca<sup>2+</sup> free HEPES buffer supplemented with 0.5 mM EGTA (Fluka Chemie) at 37 °C and then with the same buffer supplemented with 0.05 % collagenase (Invitrogen Gibco, Hepatocyte qualified



collagenase) and 0.075 % CaCl<sub>2</sub> for 20 min. The liver was then carefully disrupted and the cell suspension was filtered through 3 filters (Fisher Bioblock Scientific) of decreasing porosity. The cell suspension was centrifuged at 50 g for 2 min at 4 °C and washed for 3 times. Cellular viability was estimated by trypan-blue exclusion and dead cells were removed on a 33 % Percoll (Seromed, Merck) gradient by centrifugation at 70 g for 10 min at 4 °C. Hepatocytes were then plated in 35 mm culture dishes precoated with collagen (Biocoat, BD Biosciences) at a concentration of 5x10<sup>5</sup> cells per dish and allowed to adhere overnight in William's E medium (Sigma Aldrich) supplemented with antibiotics, 1 X glutamax, 4 µg/ml porcine insulin (Sigma) and 10 % FCS. After seeding, the supernatant was replaced by William's E medium supplemented as described above plus 2 % DMSO (Merck) and 10<sup>-7</sup> M dexamethasone (Sigma). Primary hepatocyte cultures were incubated at 37 °C in the presence of 5 % CO<sub>2</sub>.

### Viruses

Stocks of VSV<sub>tsO45</sub> (kindly provided by F. Lafay, Laboratoire de génétique des virus, Gif-sur-Yvette, Fr.) were grown in BHK-21 cells with GMEM supplemented with 2 % FCS. Infection was performed with a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.1 during 24 h at 33 °C. Recombinant adenoviruses were grown in 293 cells in DMEM supplemented with 5 % FCS. Infection was performed at 37 °C at m.o.i. 1 until complete cell lysis. Recombinant vaccinia virus VVIV205 expressing Core-E1-E2 was kindly provided by F. Kien (INSERM U544, Strasbourg, Fr.) (Kien *et al.*, in press).

### Antibodies

Detection of E2 by flow cytometry was performed using the conformation-sensitive mouse monoclonal antibody H53 (Deleersnyder *et al.*, 1997) directed against the HCV E2

glycoprotein (kindly provided by J. Dubuisson, CNRS-FRE 2369, Institut Pasteur, Lille, Fr.). Monoclonal anti-HCV E1 antibody A4 was a generous gift from H. B. Greenberg through J. Dubuisson, (Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Ca.). For immunoprecipitation experiments, anti-EGFP monoclonal antibody (Clontech), A4 and H53 were used at a dilution of 1/500. Neutralising antibodies (18B5 and 4G10) specific for the glycoprotein of the Indiana strain of VSV were kindly provided by A. Lamarre (University Hospital Zurich, Institute of Experimental Immunology, Zurich, Sw.).

### Construction of recombinant adenoviruses

Plasmid pVSV-GLI (a generous gift from J. K. Rose, Yale University, New Haven, Co., USA) and p90/HCVFL-long pU (kindly provided by C. M. Rice, Washington University, School of Medicine, St Louis, Mo., USA) (Kolykhalov *et al.*, 1997) were used to subclone the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G glycoprotein and the HCV E1 and E2 ectodomains, respectively. pEGFP-C1 (Clontech) was used as a template to amplify by PCR the EGFP coding sequence.

The chimeric gene encoding, from 5' to 3', E1 signal sequence, EGFP, E1 ectodomain, and VSV G transmembrane and cytoplasmic regions was obtained by overlapping PCR using the following primers:

- for E1 signal sequence:

oIV502 (5'-GGGGGGGCTAGCATGCCTGGTTGCTCTTTCT-3')

oIV19 (5'-CCTCGCCCTTGCTCACCATGGCTGAAGCGGGCACA-3')

- for EGFP coding sequence:

oIV20 (5'-ACTGTGCCCGCTTCAGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3')

oIV21 (5'-GAGGAATTGCGCACTTGGTAGAGTCCGGACTTGTACAGC-3')

- for E1 coding sequence truncate at amino acid 311:

oIV22 (5'-GCTGTACAAGTCCGGACTCTACCAAGTGCGCAATTCCTC-3')

oIV503 (5'-AAAAAAGAGGCAATGGAGCTCCCGGGATAGATAGAACAA-3')

- for the sequence encoding the transmembrane and cytoplasmic regions of VSV G (TmG):

oIV504 (5'-TTGTTCTATCTATCCCGGGAGCTCCATTGCCTCTTTTTT-3')

oIV505 (5'-GGGGGGACGCGTTTACCTTCCAAGTCGGTTCATC-3').

The resulting PCR fragment was digested by *NheI* and *MluI* and cloned into pTG13387 (kindly provided by TRANSGENE SA, Strasbourg, Fr.) digested with the same two enzymes, downstream of a CMV promoter sequence. This plasmid was called pIV520. The expression block containing the promoter and the transgene was then transferred into pTG6624 containing the entire adenovirus genome (also provided by TRANSGENE SA) by homologous recombination. The resulting plasmid is pIV521. A similar strategy was used to obtain pIV504 (E2 truncated at amino acid 661 fused with TmG by overlapping PCR using primers:

- for truncated E2 at amino acid 661:

oIV506 (5'-GGGGGGGCTAGCATGGTCCTGGTAGTGCTG-3')

oIV507 (5'-AAAAAAGAGGCAATGGAGCTCTCGGACCTGTCCCTGT-3')

- for TmG:

oIV508 (5'-ACAGGGACAGGTCCGAGAGCTCCATTGCCTCTTTTTT-3') and oIV505.

The resulting fragment was cloned into pTG13387 following digestion with *NheI* and *MluI*. E2-TmG was transferred into the adenovirus 5 genome by homologous recombination with pTG6624, generating plasmid pIV514.

Final plasmids pIV521 and pIV514 were then transfected into 293 cells using the calcium phosphate precipitate method, in order to obtain recombinant adenoviruses

AdIV521 and AdIV514, respectively. The strategy for both constructs is summarised on Fig. 1.

#### Analysis of the recombinant proteins

Immunoprecipitation assays were performed as follows. Huh-7 cells were seeded in 60 mm Petri dishes ( $2 \times 10^6$  cells / dish) and infected either with AdIV521 or AdIV514 (m.o.i. 100) for 48 h at 37 °C. After 1h of starvation with medium deficient in methionine and cysteine, cells were incubated with 10  $\mu$ Ci of  $^{35}$ S labelled aminoacids (NEN Life Science Products) for 5 h. Cells were then scrapped and washed twice with phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen) before lysis with N buffer (NP-40 0.2 %, Tris HCl 100 mM pH 8.8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1  $\mu$ M, aprotinin 1.5  $\mu$ g/ml). Cell lysates were sonicated and cellular fragments pelleted by centrifugation for 5 min at 13,000 g. Supernatants were incubated with monoclonal antibodies anti-EGFP, anti-E1 A4 or anti-E2 H53 (all diluted at 1/500) for 4 h at 4 °C. Protein A/G sepharose (Tebu Santa Cruz) was then added and samples were further incubated overnight at 4 °C. After centrifugation at 13 000 g for 5 min, pellets were washed three times with N washing buffer (NP-40 0.2 %, Tris HCl 100 mM pH 8.8, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM) and twice with Tris-HCl 1 mM pH 8.8. Pellets were resuspended in SDS-PAGE sample buffer (360 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 % SDS, 36 % glycerol, 6 % beta-mercaptoethanol) and proteins were submitted to electrophoresis on a 7.5 % SDS-polyacrylamide gel and autoradiographed.

#### Flow cytometry analyses

$7.5 \times 10^5$  Huh-7 cells grown in 60 mm Petri dishes were infected with AdIV514 and AdIV521 at a m.o.i. of 100 and with VViV205 at m.o.i. 0.1, removed from the plastic support at 48 h post-infection with PBS depleted in  $\text{Ca}^{2+}$  (Invitrogen) and pelleted at 400 g

for 5 min before staining. Staining was performed in the presence or absence of 0.3 % saponin with MAb H53 (1/100) or MAb A4 (1/100) at room temperature for 30 min. Cells were washed twice with PBS or saponin 0.1 %. Secondary antibody was phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG (Immunotech, 1/200 dilution). Incubation was performed at room temperature for 30 min. Cells were fixed in 1.5 % paraformaldehyde. Expression of EGFP was detected without antibody by simple observation of the natural fluorescence emitted by this protein. Flow cytometry was performed on a Beckton Dickinson FACscan apparatus.

#### Production of VSV/HCV pseudotyped virus and plaque assay

BHK-21 cells were infected with AdIV521 and AdIV514 (m.o.i. 50). After 1 h of adsorption at room temperature, GMEM medium supplemented with 2 % FCS was added and cells were incubated for 5 h at 37 °C. Cells were then super-infected with VSV<sub>tsO45</sub> (m.o.i. 2.5). Adsorption was performed at 4 °C for 1 h. GMEM supplemented with 2 % FCS was then added and cells were incubated at 40.5 °C for another 24 h. Cell culture medium was collected and clarified by centrifugation at 400 g for 5 min. Supernatant was ultracentrifugated at 20,000 g during 2 h on a 25 % (v/v) glycerol cushion. The pellet was then resuspended in PBS and aliquots were frozen at -80 °C until use.

Titres of virus stocks were determined by plaque assay using BHK-21 cells (10<sup>6</sup> cells in 35 mm dishes). Cells were infected with serial dilutions of virus and adsorption was performed at room temperature for 45 min. After removing of the inoculum, GMEM cell culture medium containing 2 % FCS and 0.8 % low melting agarose (Sigma) was added and incubation was continued for 44 h at 33 °C. Cells were stained with an additional agar overlay containing 0.005 % neutral red. Plaques were numerated after 4 h of staining at 33 °C.

### Infectivity of pseudotyped virus

Primary human hepatocytes, HepG2 and Huh-7 cells were infected at a m.o.i. of 0.001. Viral adsorption was performed at room temperature during 45 min. Cells were then washed three times with PBS and VSV titre in the supernatants of the third wash determined time 0 post-infection. Supernatants were recovered at different time p.i. and titrated on BHK-21 cells as described above.

### Neutralisation of VSV/HCV pseudotyped virus

Neutralisation assays were performed on primary human hepatocytes. VSV<sub>tsO45</sub> and pseudotyped virus stocks were incubated with 18B5 and 4G10 diluted at 1/7 500, 1/30 000, 1/90 000 or 1/180 000 for 30 min at room temperature. Cells were then infected with the neutralised virus stocks (m.o.i. 0.001). Adsorption was performed at room temperature for 45 min. Cells were washed three times with PBS before incubation at 33 °C. Supernatants were recovered at 6, 20, 28, 48 and 55 h p.i. and titrated by plaque assay as described above. Neutralisation assays were also performed on Huh-7 and HepG2 cells. Neutralised virus stocks (m.o.i. 0.001) were prepared as described above. After 45 min of viral adsorption, the inoculum was removed and cells were washed three times with PBS. Supernatants were recovered at 20 h p.i. and titrated by plaque assay as described above.

## **Results**

### Analysis of the recombinant chimeric products

To produce pseudotyped VSV particles, it was necessary to express the HCV glycoproteins E1 and E2 at the plasma membrane where VSV naturally buds. For this purpose, truncated forms of the E1 and E2 (amino acid 311 for E1 and 661 for E2) glycoproteins were fused to the transmembrane domain and cytoplasmic region of the glycoprotein G of VSV. In addition, the sequence coding for EGFP was fused to the 3' extremity of the chimeric E1-TmG gene to allow easy detection of this recombinant protein.

In order to characterise the proteins encoded by the chimeric genes, radio-immunoprecipitation experiments were performed. Lysates from cells infected either with AdIV521 (expressing EGFP-E1-TmG) or AdIV514 (expressing E2-TmG) were immunoprecipitated with a monoclonal antibody directed against EGFP, with E1-specific MAb A4 or with conformational-sensitive MAb H53 directed against E2. The chimeric protein EGFP-E1-TmG produced by AdIV521 was detected at ~60 kDa as expected (Fig. 2 lanes 1 and 4). E2-TmG produced by AdIV514 appeared as two protein species, migrating as distinct bands of ~70 kDa and 100 kDa (Fig. 2 lane 6). Experiments using endoglycosidase H and PNGase F allowed us to characterise the 70 kDa band as corresponding to an ER-associated E2 protein species, whereas the 100 kDa band corresponds to cell surface expressed endoH resistant E2 (not shown).

### Cell surface expression of HCV chimeric proteins

To determine if the chimeric E1 and E2 proteins were expressed at the cell surface, Huh-7 cells infected with AdIV521 or AdIV514 were analysed by flow cytometry using

monoclonal antibodies against E1 or E2. A recombinant vaccinia virus expressing core-E1-E2 (VVIV205) was used as a negative control for cell surface expression. As shown figure 3I, chimeric E1 could be visualised directly because of its fusion with EGFP. Detection of chimeric E1 was also performed using monoclonal antibody A4 (Fig. 3E, 3F). Modified E2 was detected using conformational-sensitive monoclonal antibody H53 as primary antibody, suggesting that the presence of the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G glycoprotein does not modify the correct folding of E2 (Fig. 3G, 3H). Cells infected with AdIV521 or AdIV514 and stained without permeabilisation by saponin treatment exhibited strong staining by anti-E1 (Fig. 3E) and anti-E2 antibodies (Fig. 3G). Detection of native E1 and E2 expressed by VVIV205 was only possible when cells were previously permeabilised by saponin (3A and 3C versus 3B and 3D). These results confirm the intracellular localisation of native E1 and native E2 expressed by VViV205 and indicate that both modified proteins are expressed at the cell surface by recombinant adenoviruses.

#### Production of VSV/HCV pseudotyped virus

In order to produce pseudotyped particles, BHK-21 cells were first infected with AdIV521 and AdIV514. After 5 hours of incubation at 37 °C, cells were super-infected with VSV<sub>ts</sub>O45 and incubated at 40.5 °C during 24 hours. Supernatants from the triple infection were ultracentrifugated on a 25 % glycerol cushion and pellets were examined for the presence of pseudotypes. Using BHK-21 cells for the titration, virus stocks displayed titres superior to 10<sup>5</sup> pfu/ml. The conservation of the temperature-sensitive phenotype was also examined. Infection of BHK-21 cells with pseudotypes at 40.5 °C did not lead to the development of a cytopathogenic effect nor in production of progeny VSV<sub>ts</sub>O45,



demonstrating that rescue of VSV<sub>ts</sub>O45 with AdIV521 and AdIV514 did not result from a reversion of the temperature-sensitive phenotype on BHK-21 cells (data not shown).

#### Infectivity of VSV/HCV pseudotypes

We then investigated the infectious properties of the pseudotyped particles. Primary human hepatocytes were infected either with pseudotypes or with VSV<sub>ts</sub>O45 at a m.o.i. of 0.001 and incubated at 33 °C to allow production of progeny VSV<sub>ts</sub>O45. Supernatants were collected at different times post-infection and the progeny virus was titrated. As shown in Fig. 4A, the growth kinetics of VSV<sub>ts</sub>O45 and pseudotyped particles were similar. In another set of experiments, both pseudotyped viruses and VSV<sub>ts</sub>O45 were preincubated with VSV neutralising antibodies (18B5 and 4G10) prior to adsorption on primary human hepatocytes. Cells were then washed extensively and incubated at 33 °C. Figure 5 shows the growth kinetics of progeny virus after treatment with VSV-neutralising antibodies diluted at 1/7 500. 100 % of growth was determined by the titre of the supernatant of untreated VSV<sub>ts</sub>O45 or pseudotypes infection. As shown in Fig. 5A, 18B5 and 4G10 antibodies diluted at 1/7 500 efficiently neutralised VSV<sub>ts</sub>O45 (less than 20 % of growth) whereas pseudotypes completely escaped neutralisation (Fig. 5B). Dilutions 1/30 000, 1/90 000 and 1/180 000 of VSV neutralising antibodies also specifically inhibited growth of VSV<sub>ts</sub>O45, but to a lesser extent (data not shown). However, neutralisation of pseudotypes infection showed variability depending on the cells used for the assay and cells from one donor (× symbol) seemed to be resistant to this infection.

The infectious properties of pseudotyped particles were also tested on Huh-7 and HepG2 cells. Growth kinetics of VSV<sub>ts</sub>O45 and pseudotypes on Huh-7 cells are shown Fig. 4B. As we previously observed on primary hepatocytes (Fig. 4A), the growth kinetics of the two viruses were similar even if we could observe a weak difference at early time

p.i. Same results were obtained on HepG2 cells (not shown). Virus stocks were then treated with neutralising antibodies specific to VSV G glycoprotein and assayed for infection using Huh-7 and HepG2 cells. Supernatants were recovered at 20 h p.i. and titrated for progeny VSV<sub>tsO45</sub>. As described above, 100 % of growth was determined by the titre the supernatant of untreated VSV<sub>tsO45</sub> or pseudotypes infection. As shown figure 5, same results were obtained on Huh-7 (Fig. 5C) and HepG2 cells (Fig. 5D). VSV<sub>tsO45</sub> was efficiently neutralised on these two cell lines but to a lesser extend compared to the results obtained on primary hepatocytes. As observed on primary hepatocytes, pseudotypes escaped neutralisation by monoclonal antibodies specific to VSV G glycoprotein. All these observations suggest that the envelope of pseudotyped particles are different from VSV G glycoprotein and that infection by these particles occurs via new determinants: modified HCV E1 and E2 glycoproteins.

## Discussion

In this study, we have produced VSV/HCV pseudotyped particles, using the temperature-sensitive VSV $tsO45$  strain and defective recombinant adenoviruses expressing E1 and E2 HCV glycoproteins localised at the plasma membrane. Previous studies have shown that E1 truncated at amino acid 311 and E2 truncated at amino acid 661 were efficiently secreted by cells (Matsuura *et al.*, 1994, Michalak *et al.*, 1997). In order to modify the normal subcellular localisation of HCV E1 and E2, these secreted forms of glycoproteins were fused to the transmembrane domain and the cytoplasmic tail of VSV G glycoprotein. These sequences were used in order to provide a membrane anchor signal, and also because they would ensure attachment of the glycoprotein on the surface of VSV budding particles (Whitt *et al.*, 1989, Owens & Rose, 1993, Robinson & Whitt, 2000). Correct expression of chimeric E1 and E2 was determined using a radio-immunoprecipitation assay which allowed the detection of modified E1 and two forms of modified E2 (70 and 100 kDa) (Fig. 2). The latter band corresponded to the form of E2-TmG harbouring complex sugars following migration through the Golgi apparatus (Dubuisson *et al.*, 1994). Using fluorescence assays (Fig.3), we observed that fusion of the ectodomain of E1 or E2 with the transmembrane domain and cytoplasmic tail of VSV glycoprotein drives their localisation to the cell surface, as expected. Recognition of modified E2 by a conformation-sensitive antibody indicates that this glycoprotein is correctly folded.

Since now, different methods have been used to generate VSV/HCV pseudotypes. Lagging and colleagues (Lagging *et al.*, 1998) have described a system in which pseudotypes are produced by co-infection of cultured cells with VSV $tsO45$  and with a recombinant vaccinia virus expressing T7 polymerase, followed by transfection of plasmids encoding the HCV E1 and E2 genes under control of a T7 promoter. However,

preparation of pseudotypes using vaccinia virus to express the heterologous envelope genes results in the production of infectious vaccinia virus particles. Consequently, stocks of pseudotypes have to be filtered through a 0.1- $\mu$ m-pore-size filter and/or treated with high-titre anti-VV serum in order to eliminate these contaminating vaccinia virus particles. Using this method, Lagging *et al.* could only obtain titres of pseudotypes in the order of magnitude of  $10^4$  pfu/ml whereas in our conditions, pseudotypes titre was greater than  $10^5$  pfu/ml, suggesting that the purification step required for the elimination of vaccinia virus results in a loss of infectious pseudotypes.

Seong *et al.* (Seong *et al.*, 1998) have constructed a recombinant adenovirus expressing the structural proteins of HCV. They were able to find large amount of HCV structural mRNAs in infected cells. Their results show that E1 and E2 interact, in adenovirus infected cells, to form heterodimers and that misfolded aggregates were only present in small quantities, contrary to what has been observed with other viral expression systems (Grakoui *et al.*, 1993, Dubuisson *et al.*, 1994). In the adenoviral context, modified E1 and E2 are under control of the CMV promoter to ensure high level of expression of these chimeric glycoproteins. The use of recombinant adenoviruses to produce pseudotyped particles is therefore most appropriate.

We have characterised the VSV/HCV pseudotyped particles using neutralising monoclonal antibodies directed against VSV (Fig. 5). In our conditions, pseudotypes completely escaped neutralisation by VSV specific antibodies, whereas VSV<sub>tsO45</sub> did not. Since antibodies specific to the VSV glycoprotein were unable to neutralise the infectivity of the pseudotyped particles, we can conclude there is little, if any, residual G glycoprotein on their surface and that infection by pseudotypes particles occurs via HCV E1 and E2. This was confirmed by a FACscan analysis where BHK-21 cells were infected in the same conditions as during production of pseudotyped particles, i.e. first by the recombinant

adenoviruses expressing modified E1 and E2, and then with VSV<sub>tsO45</sub> at 40.5 °C. Cells were subsequently stained using a monoclonal antibody against VSV G glycoprotein. In these conditions, we were not able to detect any G glycoprotein at the cell surface of the infected cells (data not shown). Altogether, these results indicate that infection by VSV/HCV pseudotypes requires and occurs following binding of E1 and/or E2 to the surface of target cells. We have observed that treatment of pseudotypes with VSV neutralising antibodies allowed a higher infectivity of these particles mainly on primary hepatocytes, as deduced by the high titres obtained (Fig. 5B). Primary human hepatocytes are known to express high levels of Fc receptors at their surface. We can thus hypothesise that binding of free VSV-neutralising antibodies to Fc receptors induces some cellular modifications that render hepatocytes more susceptible to infection by pseudotypes.

Up to date, and although several candidate molecules have been proposed (see Flint *et al.*, 2001 for a review), the identity of HCV receptor(s) remains largely unknown. Low-density lipoprotein receptor (LDLr) has been hypothesised as a candidate to this function and published studies have indeed shown that LDLr is involved in HCV penetration on cellular membrane, since MAbs against LDLr were able to decrease the infectivity of pseudotyped particles (Thomssen *et al.*, 1992, Wunschmann *et al.*, 2000). Another receptor candidate is CD81, a member of the tetraspanin family. It is now clearly established that HCV E2 can bind CD81 *in vitro* but the presence of CD81 is not sufficient to render a cell line susceptible to HCV infection (Pileri *et al.*, 1998, Flint *et al.*, 1999) and CD81 may not be necessary for HCV infection (Petracca *et al.*, 2000). Our results are in agreement with these observations since our pseudotypes are able to infect HepG2 cells which do not express CD81 at their surface. Contradictory results on the cellular tropism of pseudotyped virus have been reported depending on the method used to produce particles. Pseudotyped viruses produced by Lagging *et al.*, 1998 exhibited the highest infectious titre on BHK-21

cells whereas those generated by Matsuura *et al.*, 2001 were highly infectious for HepG2 cells and not for BHK-21 cells. More recently, recombinant VSV expressing HCV glycoproteins instead of the G glycoprotein showed no infectivity on HepG2 cells although the chimeric HCV glycoproteins used in this study were the same as those used by Matsuura *et al.* (Buonocore *et al.*, 2002). One possible explanation for these contradictory results, as proposed by these authors, may reside in the nature of the system used to express modified E1 and E2, i.e. transient or long-term expression. This hypothesis has yet to be confirmed. Our own results indicate that pseudotypes are able to infect various cell lines, including BHK-21, Huh-7 and HepG2 cells, as well as primary human hepatocytes although the HCV glycoproteins were produced using a transient expression system

In this study, we have developed a new method to generate VSV/HCV pseudotyped particles. The use of non-replicative recombinant adenoviruses instead of transfection to express HCV glycoproteins ensure a high level of expression of these glycoproteins and pseudotypes obtained are devoid of viral contamination. Our system is highly reproducible and efficient and pseudotyped particles generated by this way represent a useful tool to study early stages of HCV infection.

## **Acknowledgements**

We thank C.A. Pereira for critical reading of the manuscript. A. C was supported by grants from Région Alsace and Inserm.

## Reference List

**Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M. & Rose, J. K. (2002).** Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **76**, 6865-6872.

**Clarke, B. (1997).** Molecular virology of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **78** ( Pt 10), 2397-2410.

**Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.-C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1999).** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **73**, 2641-2649.

**Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998).** A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology* **72**, 2183-2191.

**David, P., Viollon, C., Alexandre, E., Azimzadeh, A., Nicod, L., Wolf, P., Jaeck, D., Boudjema, K. & Richert, L. (1998).** Metabolic capacities in cultured human hepatocytes obtained by a new isolating procedure from non-wedge small liver biopsies. *Hum.Exp.Toxicol.* **17**, 544-553.

**Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., & Dubuisson, J. (1997).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697-704.

**Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994).** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope



glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**, 6147-6160.

**Flamand, A. & Bishop, D. H. (1973).** Primary in vivo transcription of vesicular stomatitis virus and temperature-sensitive mutants of five vesicular stomatitis virus complementation groups. *Journal of Virology* **12**, 1238-1252.

**Flint, M. & McKeating, J. A. (1999).** The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *Journal of General Virology* **80**, 1943-1947.

**Flint, M. & McKeating, J. A. (2000).** The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Reviews in Medical Virology* **10**, 101-117.

**Flint, M., Quinn, E. R. & Levy, S. (2001).** In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clinics in Liver Disease* **5**, 873-893.

**Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. & McKeating, J. A. (1999).** Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **73**, 6782-6790.

**Fournillier, A., Depla, E., Karayiannis, P., Vidalin, O., Maertens, G., Trépo, C. & Inchauspé, G. (1999).** Expression of noncovalent hepatitis C virus envelope E1-E2 complexes is not required for the induction of antibodies with neutralizing properties following DNA immunization. *Journal of Virology* **73**, 7497-7504.

**Gallione, C. J. & Rose, J. K. (1985).** A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *Journal of Virology* **54**, 374-382.

- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993).** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385-1395.
- Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. & Choo, Q. L. (1991).** Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* **14**, 381-388.
- Ito, H., Watanabe, S., Takada, A. & Kawaoka, Y. (2001).** Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of Virology* **75**, 1576-1580.
- Kien, F., Abraham, J.-D., Schuster, C. & Kieny, M.-P. (2002).** Analysis of the subcellular localisation of hepatitis C virus E2 glycoprotein in live cells using an EGFP fusion protein. *Journal of General Virology*, in press.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997).** Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-574.
- Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J. & Ray, R. (1998).** Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *Journal of Virology* **72**, 3539-3546.
- Lanford, R. E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C. & Kim, J. (1993).** Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* **197**, 225-235.

**Matsuura, Y., Harada, T., Makimura, M., Sato, M., Aizaki, H., Suzuki, T. & Miyamura, T. (1994).** Characterization of HCV structural proteins expressed in various animal cells. *Intervirology* **37**, 114-118.

**Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robinson, C. S., Whitt, M. A. & Miyamura, T. (2001).** Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263-275.

**Meyer, K., Basu, A. & Ray, R. (2000).** Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* **276**, 214-226.

**Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997).** Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology* **78 ( Pt 9)**, 2299-2306.

**Owens, R. J. & Rose, J. K. (1993).** Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **67**, 360-365.

**Pauza, C. D. (1991).** The endocytic pathway for human immunodeficiency virus infection. *Adv.Exp.Med.Biol.* **300**, 111-138.

**Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S. & Grandi, G. (2000).** Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *Journal of Virology* **74**, 4824-4830.

**Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998).** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.

**Robinson, C. S. & Whitt, M. A. (2000).** The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *Journal of Virology* **74**, 2239-2246.

**Schnell, M. J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E. & Rose, J. K. (1996).** Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **93**, 11359-11365.

**Schnitzer, T. J., Dickson, C. & Weiss, R. A. (1979).** Morphological and biochemical characterization of viral particles produced by the tsO45 mutant of vesicular stomatitis virus at restrictive temperature. *Journal of Virology* **29**, 185-195.

**Seong, Y. R., Lee, C. H. & Im, D. S. (1998).** Characterization of the structural proteins of hepatitis C virus expressed by an adenovirus recombinant. *Virus Res.* **55**, 177-185.

**Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Cabezon, T., Farci, P., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1996).** A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* **223**, 409-412.

**Stephenson, J. (1998).** Defective adenoviruses as novel vaccines for the flaviviridae. *Clinical and Diagnostic Virology* **10**, 187-194.

**Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y. & Miyamura, T. (2000).** Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 5066-5074.

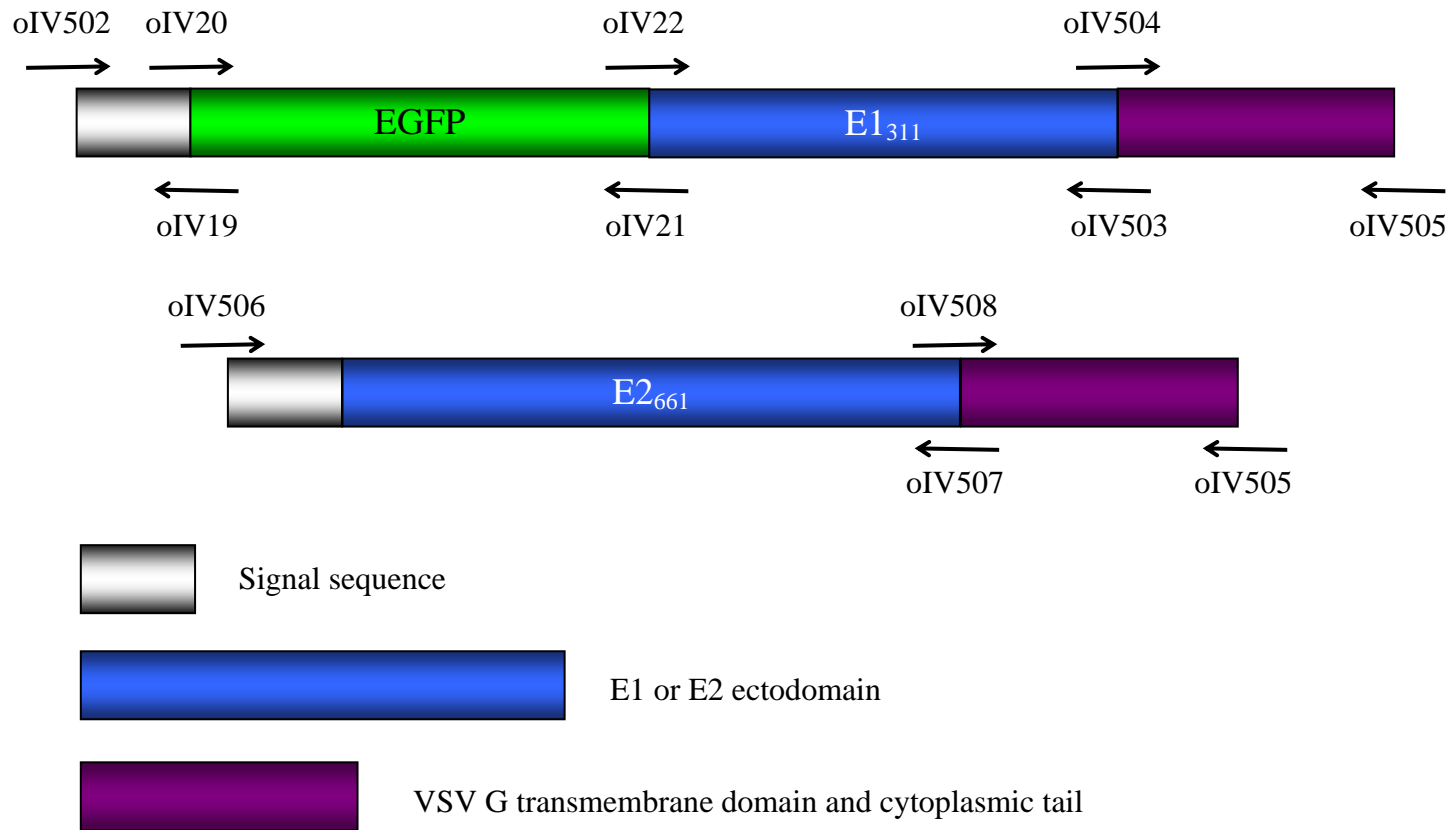
**Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G. & Uy, A. (1992).** Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* **181**, 293-300.

**Whitt, M. A., Chong, L. & Rose, J. K. (1989).** Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *Journal of Virology* **63**, 3569-3578.

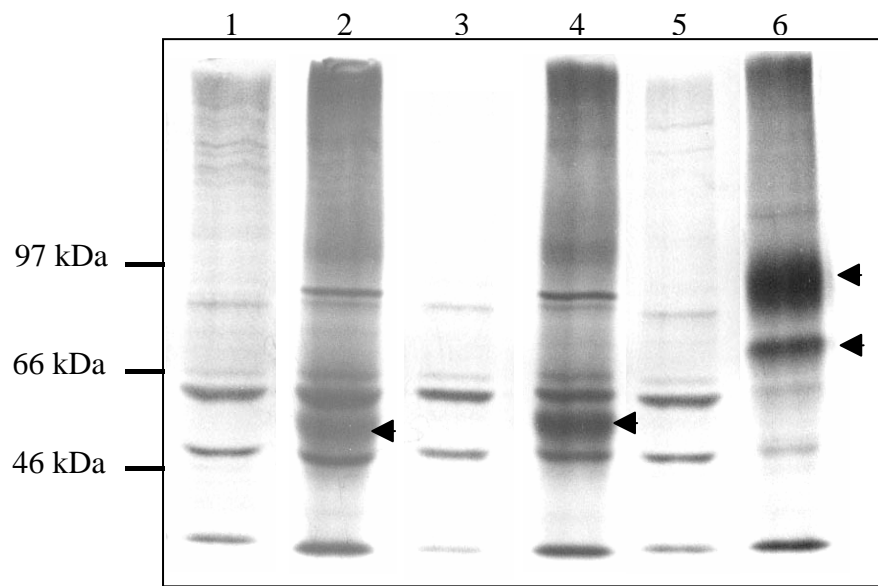
**Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. & Stapleton, J. T. (2000).** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Virology* **74**, 10055-10062.

**Zavada, J. (1982).** The pseudotypic paradox. *Journal of General Virology* **63 (Pt 1)**, 15-24.

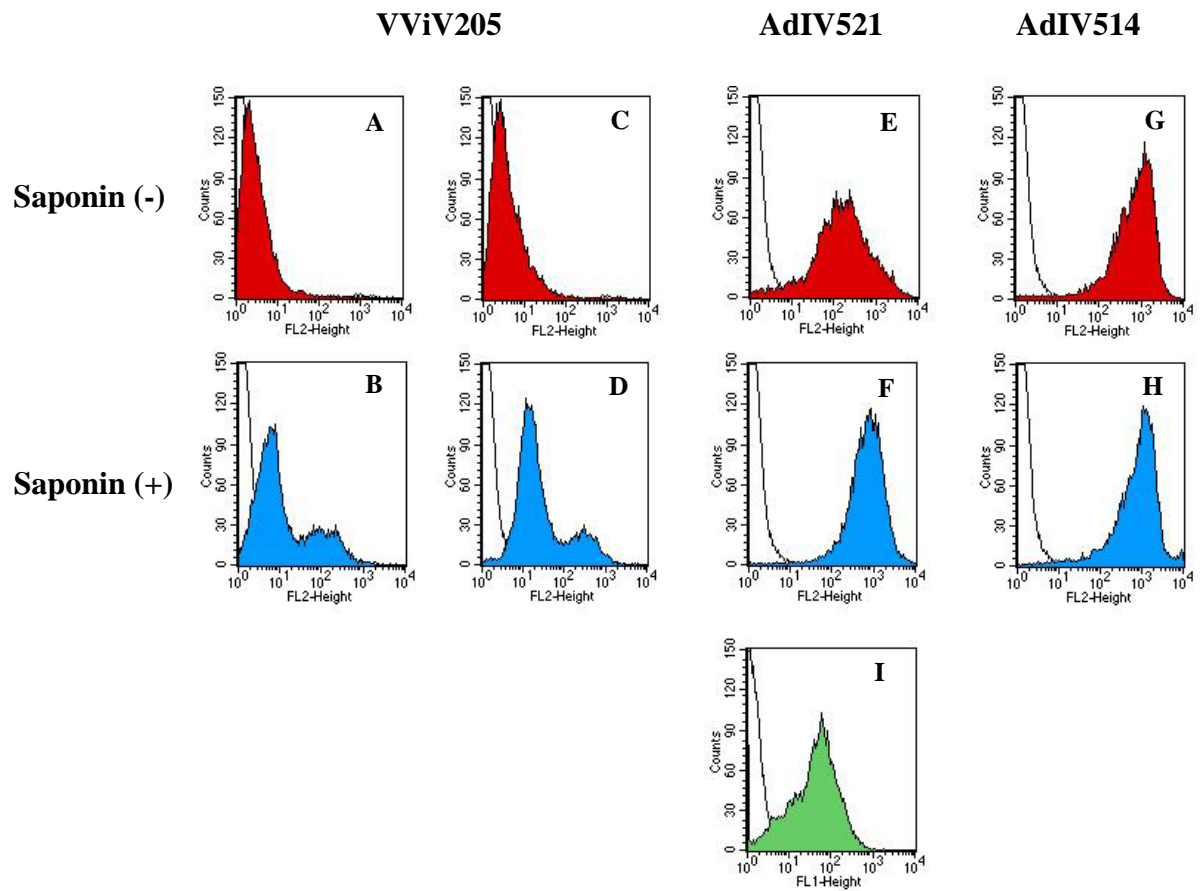
**Zibert, A., Schreier, E. & Roggendorf, M. (1995).** Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* **208**, 653-661p.



**Figure 1.** Schematic representation of the E1 and E2 chimeric HCV envelope genes. The designation of the oligonucleotide primers used is noted under or above the arrows.

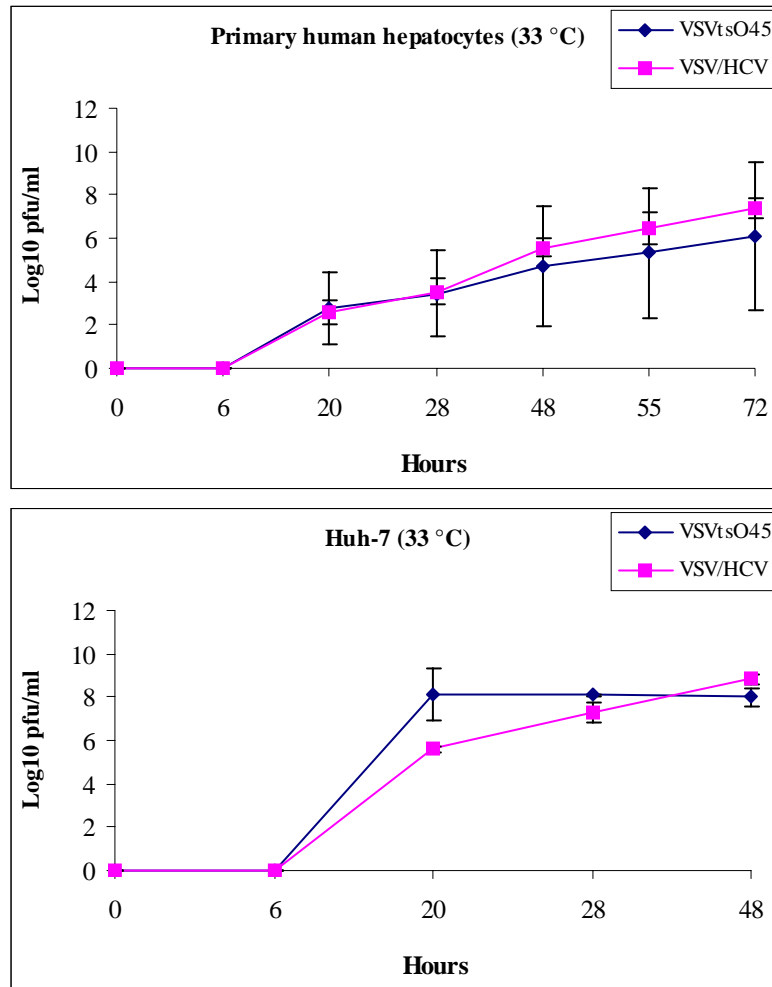


**Figure 2.** Radio-immunoprecipitation of proteins synthesised in Huh-7 cells infected for 48 h with AdIV521 or AdIV514. Cells were labelled as described in Materials and Methods. Lanes 1, 3 and 5: non infected cells; lanes 1 and 2: monoclonal anti-EGFP; lanes 3 and 4: monoclonal anti-E1 A4; lanes 5 and 6: conformation-sensitive monoclonal anti-E2 H53.

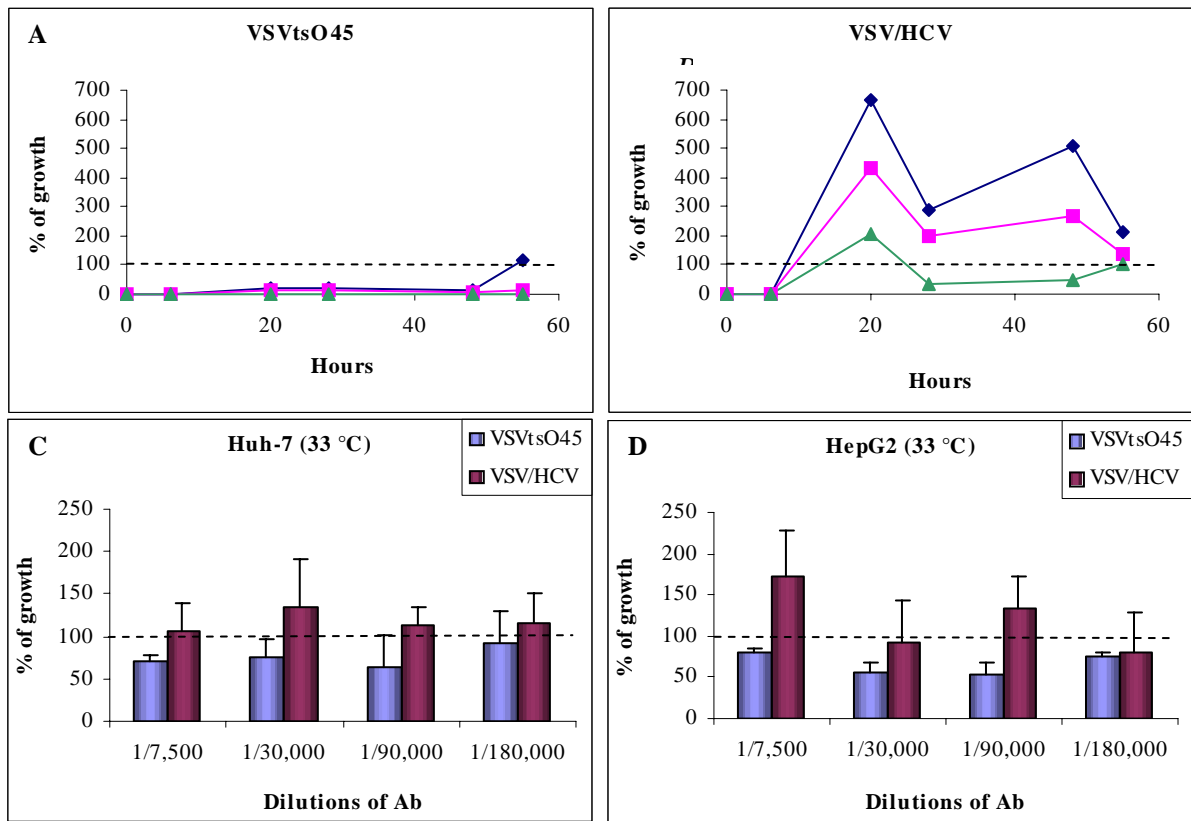


**Figure 3.** Cell surface expression of chimeric HCV envelope proteins. Control cells are represented by open peaks. Huh-7 cells were infected either with VViV205 (A, B, C, D), with AdIV521 (E, F, I) or with AdIV514 (G, H). EGFP-E1<sub>311</sub>-TmG was visualised directly (I). Cells were stained with mAb A4 (A, B, E, F) or with mAb H53 (C, D, G, H) without permeabilisation (A, C, E, G) or after permeabilisation with saponin (B, D, F, H).





**Figure 4.** Kinetics of progeny virus growth. Primary human hepatocytes (A) or Huh-7 cells (B) were infected with VSV/HCV pseudotypes or VSV<sub>ts</sub>O45 at 33 °C. Supernatants were recovered at different times post-infection and titrated by plaque assay.



**Figure 5.** Kinetics of progeny virus growth after treatment with VSV-neutralising antibodies. Primary human hepatocytes were infected with VSVtsO45 (A) or VSV/HCV pseudotypes (B) after incubation with both 18B5 and 4G10 neutralising antibodies diluted at 1/7 500 as described in Materials and Methods. Supernatants were recovered at different times post-infection and titrated by plaque assay. Symbols (◆, ■, ×) represent three distinct experiments. Same experiment was performed on Huh-7 cells (C) and HepG2 cells (D) and supernatants were recovered at 20 h p.i. Titre of the supernatants of untreated viruses determine 100 % of growth.

## NOTE

Afin d'en faciliter la lecture, les légendes des figures des articles ont été placées en-dessous de celle-ci

Publication n°2

(Article en préparation)

## Publication 2

**Low-pH exposure and clathrin-mediated endocytosis are involved in  
VSV/HCV pseudotypes fusion with hepatic cells.**

Audrey Codran<sup>1</sup>, Cathy Royer<sup>1</sup>, Daniel Jaeck<sup>2</sup>, Michèle Bastien-Valle<sup>1</sup>, Marie Paule Kieny<sup>1</sup>, Jean-Pierre Martin<sup>1</sup>

1: Inserm U544, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67 000 Strasbourg, France

2: Centre de Chirurgie Viscérale et de Transplantation, Centre Hospitalier de Hautepierre,  
Strasbourg, France

(Manuscrit en préparation)

## **Summary**

In this report, we have used VSV/HCV pseudotyped viruses to study HCV entry into primary human hepatocytes and Huh-7 hepatic cells. We have determined that pseudotypes fusion is maximal at pH 6.02 and the use of lysosomotropic drugs allowed us to confirm that fusion requires passage through the endosomal system. To better understand mechanisms of HCV penetration into host cells, we have inhibited endocytosis by different drugs: brefeldin A and chlorpromazine for clathrin-mediated endocytosis, filipin for caveolae-dependent endocytosis and cytochalasin D for macropinocytosis. Our results indicate that most of pseudotypes enter host cells via a clathrin-dependent pathway. However, we can not exclude that a small fraction of pseudotypes enter host cells via caveolae-dependent endocytosis and macropinocytosis. Our observations are in agreement with the description of putative receptors for HCV.

## Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the major causative agent of parenterally transmitted non-A non-B hepatitis (Alter *et al.*, 1989, Choo *et al.*, 1989). In most cases, HCV infection leads to chronic hepatitis, resulting in the development of cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Neither a vaccine nor a completely effective therapy is available yet to control HCV infection.

HCV is a positive strand RNA virus which belongs to the *Flaviviridae* family. Its genome of 9.6 kb encodes a polyprotein of about 3000 amino acids. This polyprotein precursor is processed by cellular and viral proteases to yield structural (Core, E1, E2 and p7) and non structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B). HCV envelope is formed by E1 and E2 heterodimers non-covalently associated (Deleersnyder *et al.*, 1997, Cocquerel *et al.*, 2000, Op De Beeck *et al.*, 2001). These glycoproteins localize in the endoplasmic reticulum (ER) (Lanford *et al.*, 1993, Dubuisson *et al.*, 1994, Deleersnyder *et al.*, 1997, Flint & McKeating, 1999), where HCV budding is thought to occur. Envelope glycoproteins E1 and E2 are essential determinants for virus entry into cells (Flint & McKeating, 2000). Molecules responsible for binding and internalization of HCV on host cells are still unknown. However, different receptor candidates have been proposed. It has been shown that, *in vitro*, E2 can specifically bind human CD81, member of the tetraspanin family (Pileri *et al.*, 1998, Flint *et al.*, 1999a). Nevertheless, such an interaction does not result in internalization of the bound virion (Petracca *et al.*, 2000). An other receptor candidate is the low-density lipoprotein receptor (rLDL) (Thomssen *et al.*, 1992, Wunschmann *et al.*, 2000) and binding of HCV on rLDL could lead to internalization of the virus (Agnello *et al.*, 1999). A role of glycosaminoglycans (GAGs) have also been proposed (Germi *et al.*, 2002). These surface molecules are present on various cellular types and may constitute a low affinity receptor of HCV on target cells. Binding of HCV

with GAGs could allow an interaction with a specific receptor with a higher affinity to HCV but this hypothesis has yet to be proven.

If many reports concern the identification of HCV receptor(s), only few data are available concerning penetration and fusion of HCV with the host cells. After attachment, enveloped viruses can enter cells via two major pathways: by direct fusion at the plasma membrane which is a pH-independent mechanism, or by endocytosis and fusion with intracellular membranes, which is a pH-dependent route. Viruses belonging to the *Flaviviridae* enter cells via endocytosis and first results on HCV penetration suggest that HCV also enters cells by endocytosis. Recently, Miyamura and colleagues have developed a fusion assay (Takikawa *et al.*, 2000). In this test, HCV E1 and E2 are expressed at the plasma membrane. Fusion is measured by activation of a reporter gene in the target cell. The authors have shown that E1 and E2 fusion activity was enhanced by low-pH treatment, suggesting that HCV enter cells via the endosomal pathway and that E1 and/or E2 may undergo conformational modifications which allow fusion of viral and cellular membranes. These observations have been confirmed by the use of pseudotyped particles by Ray's group (Meyer *et al.*, 2000). In this report, the authors showed that infectivity of pseudotypes is reduced when cells are treated with H<sup>+</sup>-ATPase inhibitory drugs, suggesting that HCV fusion is a pH-dependent mechanism.

Viral entry via endocytosis has been extensively studied. The first molecule shown to be implicated in endocytosis is clathrin (for a review, see Brodsky *et al.*, 2001). Clathrin is assembled on the inside face of plasma membrane in response to an internalization signal, and form a characteristic invagination named clathrin coated-pit. Coated-pit vesicles can be easily identified by electron microscopy and different viruses, like influenza virus, vesicular stomatitis virus (VSV) or Semliki forest virus (SFV), have been observed in such vesicles (Marsh & Helenius, 1980, Matlin *et al.*, 1981, 1982). It has been



recently described that endocytosis can also use caveolae. Caveolae are spherical invaginations of the plasma membrane which are associated with vesicles. These structures are rich in cholesterol and sphingolipids (for a review, see Stan, 2002). Yet, the only virus known to enter cells via caveolae is SV-40 (Norkin, 1999, Parton & Lindsay, 1999). Internalization by caveolae seems to be slower than endocytosis clathrin-dependent and such a mechanism exists only in activated cells (Thomsen *et al.*, 2002). Both clathrin and caveolae endocytosis require the binding of the virus on its specific receptor. Macropinocytosis has been described as a non-specific internalization pathway because fixation of the virus on its receptor is not required. Instead, formation of endocytic vesicles occurs as a response to cell stimulation, resulting in the closure of lamellipodia at the sites of membrane ruffling to form large and irregular vesicles named macropinosomes. Macropinosomes are able to acidified, suggesting that they could represent a possible route of entry of a variety of viruses (review: Sieczkarski & Whittaker, 2002).

In order to study HCV penetration in host cells, we have generated VSV/HCV pseudotyped particles, using a novel approach (Codran *et al.*, in preparation). We have modified HCV E1 and E2 to localized them at the cell surface by fusing their ectodomains (truncation at amino acid 311 for E1 and 661 for E2) to the transmembrane domain and the cytoplasmic tail of VSV G glycoprotein. Modified E1 and E2 were expressed in the cells by defective recombinant adenoviruses. To generate pseudotypes, cells were co-infected by both recombinant adenoviruses on one hand, and by VSV<sub>ts</sub>O45 on the other hand. The temperature sensitive mutant VSV<sub>ts</sub>O45 is characterized by a single amino acid substitution in the G glycoprotein, leading to misfolding and retention of G in the ER at the non permissive temperature of 40.5 °C (Whitt *et al.*, 1989). Infection of VSV<sub>ts</sub>O45 at 40.5 °C results in the production and budding of non-enveloped, thus non infectious VSV virions (Flamand & Bishop, 1973, Schnitzer *et al.*, 1979, Gallione & Rose, 1985). VSV

entry into host cells have been well studied. It is known that VSV fusion requires low-pH exposure (Dahlberg, 1974, Fredericksen & Whitt, 1995). The observation that lysosomotropic agents block infection demonstrate the implication of the endosome-lysosome system in VSV entry (Miller & Lenard, 1980). Clathrin-mediated endocytosis is also involved in VSV penetration since VSV virions can easily be observed in coated-pit vesicles by electron microscopy (Matlin *et al.*, 1982).

Neutralization assays performed on hepatic cell lines (HepG2 and Huh-7) and on primary human hepatocytes allowed us to show that infection by pseudotypes occurs via new determinants, i.e. modified E1 and E2, present at their surface (Codran *et al.*, in preparation).

In this report, we tried to elucidate the mechanism used by the pseudotypes for viral entry. For this purpose, we have first determine the optimal pH required for viral and cellular membranes fusion. We have also tested a large range of endocytosis inhibitors to better characterize the endocytic pathway used by pseudotypes to enter host cells.

## **Materials and methods**

### Cells lines

Baby hamster kidney cells (BHK-21, reference CCL-10), HepG2 human hepatoma cells (reference HB-8065) and 293 human embryonic kidney cells (reference CRL-1573) were obtained from the American Type Culture Collection. The human hepatoma cell line Huh-7 was kindly provided by R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Dept of Molecular Biology, Heidelberg, Germ.). BHK-21 cells were maintained in Glasgow medium (GMEM, Invitrogen) supplemented with 5 % foetal calf serum (FCS, Invitrogen), 10 % tryptose phosphate broth and gentamycin (50 µg/ml). HEK 293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10 % FCS, 1 X glutamax (Invitrogen) and gentamycin (50 µg/ml). HepG2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS, 1 mM sodium pyruvate and gentamycin (50 µg/ml). Huh-7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS, 1 X glutamax, 1 mM sodium pyruvate, 1 X non essential amino acids (Invitrogen) and gentamycin (50 µg/ml).

### Human hepatocytes isolation

Primary human hepatocytes were prepared as described elsewhere (David *et al.*, 1998). Briefly, liver resection samples were obtained in agreement with the local Ethics Committee from patients undergoing partial hepatectomy for a metastatic liver tumor (Centre de Chirurgie Viscérale et de Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Hautepierre, Strasbourg, Fr.). The liver sample was perfused first with Ca<sup>2+</sup> free HEPES buffer supplemented with 0.5 mM EGTA (Fluka Chemie) at 37 °C and then with the same buffer supplemented with 0.05 % collagenase (Invitrogen Gibco, Hepatocyte qualified

collagenase) and 0.075 % CaCl<sub>2</sub> for 20 min. The liver was then carefully disrupted and the cell suspension was filtered through 3 filters (Fisher Bioblock Scientific) of decreasing porosity. The cell suspension was centrifuged at 50 g for 2 min at 4 °C and washed for 3 times. Cellular viability was estimated by trypan-blue exclusion and dead cells were removed on a 33 % Percoll (Seromed, Merck) gradient by centrifugation at 70 g for 10 min at 4 °C. Hepatocytes were then plated in 35 mm culture dishes precoated with collagen (Biocoat, BD Biosciences) at a concentration of 8x10<sup>5</sup> cells per dish and allowed to adhere overnight in William's E medium (Sigma Aldrich) supplemented with antibiotics, 1 X glutamax, 4 µg/ml porcine insulin (Sigma) and 10 % FCS. After seeding, the supernatant was replaced by William's E medium supplemented as described above plus 2 % DMSO (Merck) and 10<sup>-7</sup> M dexamethasone (Sigma). Primary hepatocyte cultures were incubated at 37 °C in the presence of 5 % CO<sub>2</sub>.

### Viruses

Stocks of VSV<sub>ts</sub>O45 (kindly provided by F. Lafay, Laboratoire de génétique des virus, Gif-sur-Yvette, Fr.) were grown in BHK-21 cells with GMEM supplemented with 2 % FCS. Infection was performed with a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.1 during 24 h at 33 °C.

Recombinant adenoviruses were grown in 293 cells in DMEM supplemented with 5 % FCS. Infection was performed at 37 °C at m.o.i. 1 until complete cell lysis.

### R18 labelling of viruses

Stocks of VSV<sub>ts</sub>O45 and pseudotyped viruses were diluted in PBS (1/10) and the amount of proteins was determined using the Bradford method. The lipid probe R18 (octadecylrhodamine B chloride) was then added at the final concentration of 1 mg/ml and

immediately mixed with the viruses. Incubation was performed in the dark, at room temperature during 20 min with frequent agitation. The non-incorporated probe was eliminated by dialysis with a threshold of 10 kDa against 1 l of PBS during 4 hours, repeated 3 times. Labeled viruses were titrated by plaque assay and aliquots were conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Incorporation of R18 was estimated with the following procedure: labeled and non-labeled viruses were diluted 10 and 100 times in PBS and 0.1 % triton X-100 was added. Fluorescence emitted was measured at 560 nm on a spectrofluorometer.

#### Determination of the fusion pH

$2 \times 10^6$  BHK-21, HepG2 or Huh-7 cells or  $8 \times 10^5$  primary human hepatocytes were seeded in 35 mm petri dishes. Cells were scraped from the plastic support and washed with PBS. Cells were then incubated with PBS adjusted at different pH for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Medium was eliminated and labeled viruses were added. Incubation was performed at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark, for 30 min. Cells were then washed and incubated in PBS adjusted at different pH for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Cells were fixed in 1.5 % paraformaldehyde. Fusion was determined by reading the emitted fluorescence on a Beckton Dickinson FACscan apparatus.

#### Test of endocytosis inhibitors

BHK-21, HepG2, Huh-7 and human primary hepatocytes were prepared as described above. Cells were then incubated either with monensin  $10\ \mu\text{M}$ , chloroquine  $100\ \mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $300\ \mu\text{M}$ , chlorpromazine  $100\ \mu\text{M}$ , cytochalasin D  $10\ \mu\text{M}$ , brefeldine A (BFA)  $10\ \mu\text{M}$  or with filipin 0.05 % (all purchased from Sigma Aldrich). After 20 min of incubation at room temperature, medium was replaced with labeled viruses and cells were

incubated for another 30 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed and incubated with culture medium containing the inhibitor tested at 37 °C for 30 min. After washing, cells were fixed in 1.5 % paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry on a FACscan apparatus.

## Results

### Effects of pH on pseudotypes fusion with host cells

In a previous study, we have shown that VSV/HCV pseudotypes were able to infect human hepatoma cell lines, such as HepG2 or Huh-7 cells, as well as primary human hepatocytes. However, mechanisms of infection still have to be understood. In a first step, we tried to determine if fusion of pseudotypes was pH-dependent or independent. For this purpose, we used a lipid probe (R18) to label viral particles. As shown figure 1, we could confirm that optimal pH required for VSV<sub>tsO45</sub> fusion was comprised between 5.6 and 5.8 as described in the literature. These results were highly reproducible whatever the cell line tested and allowed us to validate our method of virus labeling and measurement of fusion. Fusion could be observed on the four cell types tested. However, we could notice that fusion efficiency differed following the cell line: VSV could fused at a high level to BHK-21 membranes (Fig. 1A) and HepG2 membranes (Fig. 1B) at a lower extend, but fusion was very low on Huh-7 cells (Fig. 1C) and on primary human hepatocytes (Fig. 1D). Optimal pH for fusion of pseudotypes with the target cell was determined to be comprised between 6.02 and 6.2 (Fig. 1). As observed for VSV<sub>tsO45</sub>, pH determined for maximal fusion was the same on the four cell lines but efficiency of fusion was different between the cell types tested. Pseudotypes could fused to Huh-7 (Fig. 1C) and primary human hepatocytes membranes (Fig. 1D) at a high level but fusion with BHK-21 (Fig. 1A) and HepG2 membranes (Fig. 1B) was strongly reduced.

The fact that pseudotypes fusion was observed at acidic pH indicates that these viruses enter host cells via a pH-dependent pathway. Moreover, we have shown that fusion was more or less efficient considering the cell type used. This observation may release on the affinity of the receptor recognized by the pseudotypes at the cell surface.

### Inhibition of the endosomal pathway

In order to complete our previous observations, we tested the effects of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , chloroquine and monensin, molecules known to modify endosomal pH, on pseudotypes fusion. Solutions of PBS adjusted at pH 5.6 for VSV $ts$ O45 and at pH 6.02 for pseudotypes were used as positive controls, as determined above. As shown figure 2, fusion of VSV $ts$ O45 was highly reduced after treatment with these drugs, whatever the cell type tested. However, as observed in the previous experiment, VSV fusion was less efficient with Huh-7 cells (Fig. 2C) and with primary human hepatocytes (Fig. 2D) than with BHK-21 (Fig. 2A) or HepG2 cells (Fig. 2B). These results allowed us to confirm that VSV $ts$ O45 enters cells via endocytosis. Pseudotypes fusion was also decreased when cells were treated with lysosomotropic drugs (Fig. 2), confirming the fact that endocytosis may serve for HCV entry into the host cells. However, we did not observe significant decrease of pseudotypes fusion after treatment with chloroquine. As observed in figure 1, fusion of pseudotypes was more efficient on Huh-7 cells (Fig. 2C) and primary human hepatocytes (Fig. 2D). For this reason, we decided to follow this study on Huh-7 cells and primary human hepatocytes exclusively.

### Characterization of the endocytic pathway used by pseudotypes

For this purpose, we measured viral fusion after treatment of cells by different inhibitors of endocytic pathways (Table 1). As shown Fig. 3, we could observe a strong reduction of fusion with Huh-7 cells after treatment with BFA and chlorpromazine (60-70 % of reduction), but only a partial decrease of fusion after treatment with cytochalasin D and filipin (about 40 % of decrease). These results suggest that pseudotypes enter Huh-7 cells by clathrin-mediated endocytosis but we can not exclude that part of pseudotypes use caveolae-dependent endocytosis and macropinocytosis as alternative pathway for viral



entry. Similar results were obtained on primary human hepatocytes. Treatment of cells by BFA led to 90 % of fusion decrease and more than 50 % of inhibition of fusion was observed after treatment with chlorpromazine, suggesting that clathrin-mediated endocytosis is the major pathway used by pseudotypes for viral entry in primary hepatocytes. As previously observed on Huh-7 cells, treatment of cells with cytochalasin D or filipin induced a weak decrease of viral fusion, indicating that macropinocytosis and caveolae-dependent endocytosis may not be preferentially used for viral entry. However, these endocytic pathways may be alternative entry route for pseudotypes. In order to validate our results, this assay was made in parallel with VSV<sub>ts</sub>O45 on BHK-21 cells (Fig. 3). We could observe that fusion of VSV<sub>ts</sub>O45 was inhibited when cells were treated with BFA or chlorpromazine (50 % of inhibition) and not after treatment with cytochalasin D or filipin, confirming that VSV<sub>ts</sub>O45 enters host cells via clathrin-dependent endocytosis, as described in the literature.

## Discussion

Most enveloped viruses are known to enter host cells by attachment to cellular receptor, followed by fusion of the viral membrane either at neutral or acid pH (White, 1990). Thus, viruses can be classified as pH-dependent or pH-independent. However, distinction between these two classes of viruses is not as clear cut as it seems: pH-independent viruses can enter cells via endocytic vesicles and this acid environment does not block their delivery in the cytoplasm (Marsh & Pelchen-Matthews, 2000). On the contrary, pH-dependent viruses require low pH to induce membrane fusion and a modification of endosomal pH can block their fusion. The development of lipid probes has provided tools to measure viral fusion with cellular membranes. In our test, we have used the lipid fluorescent dye octadecyl-rhodamine B (R18). R18 can be incorporated into virus under self-quenching conditions. Once fusion has occurred, the fluorophore diffuses into the larger target membrane resulting in an increase of the fluorescence signal (review: Blumenthal *et al.*, 2002). Modifications of the fluorescence signal can be easily detected by flow cytometry.

In order to validate our method of measurement of viral fusion, we performed assays with R18-labeled VSV $\Delta$ tsO45. Preliminary fusion studies were performed with this virus on BHK-21 cells to optimize the assay. We determined that cells have to be pre-treated 30 min by the different drugs, that labeled virus should be in contact 30 min with the cells before allowing the fusion at 37 °C and finally, that the multiplicity of infection should be 50 pfu/cell (which is correlated with the total viral protein concentration of 40  $\mu$ g).

We could confirm that fusion of VSV $\Delta$ tsO45 requires low-pH exposure (comprised between 5.6 and 5.8 in our conditions), as described in the literature (Fredericksen & Whitt, 1995). The use of endosomal pH modulators (NH<sub>4</sub>Cl, chloroquine and monensin in

our study) allowed to demonstrate the implication of the endosomal pathway in VSV<sub>ts</sub>O45 penetration into the host cells. When cells were treated with BFA or chlorpromazine, VSV<sub>ts</sub>O45 fusion was strongly reduced (50 % of inhibition) indicating that this virus enters cells via clathrin-mediated endocytosis, as reported in a previous study (Superti *et al.*, 1987). We also determined that fusion was more efficient with BHK-21 and HepG2 cells compared with Huh-7 and primary hepatocytes.

Once our method validated, we performed these assays using R18-labeled pseudotypes. We found that optimal pH required for pseudotypes fusion was comprised between 6.02 and 6.2, thus confirming previous reports suggesting that HCV enters host cells via endosome (Meyer *et al.*, 2000, Takikawa *et al.*, 2000). If the optimal pH determined for fusion was the same on the different cell types tested, fusion of pseudotypes showed better efficiency with Huh-7 cells and primary hepatocytes than with BHK-21 and HepG2 cells, on the contrary to what has been observed with VSV<sub>ts</sub>O45. This difference can be due to the number of receptors on the cell surface or to the use of another way of pseudotypes internalization. All together, these results also demonstrate that fusion of pseudotypes does not involve the same determinants as those responsible for VSV fusion, thus proving that pseudotypes infection occurs via HCV E1 and E2 and not by residual VSV G glycoprotein.

To generate our pseudotyped particles, we had to address HCV glycoproteins at the plasma membrane. For this purpose, the C-terminal regions of E1 and E2 were removed and exchanged with the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G glycoprotein, which represent the 50 C-terminus amino acids of G (Codran *et al.*, in preparation). It has been shown that VSV G fusion peptide was localized in the N-terminal region, between amino acids 117 and 136 (Whitt *et al.*, 1990, Fredericksen & Whitt, 1995). This indicates

that fusion of pseudotypes occurs via HCV E1 and/or E2 and not by the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G.

Lysosomotropic amines such as  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or chloroquine and carboxyl-ionophore (monensin in our study) are used to modify the endosomal pH. We have shown that treatment of cells with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and monensin strongly reduced pseudotypes fusion. These results allowed us to confirm that penetration of pseudotypes in the host cell requires passage through the endosome, where HCV glycoproteins undergo conformational change into a fusion-competent state. Interestingly, we did not observe significant decrease of fusion after treatment with chloroquine. Both monensin and chloroquine have been described to cause the loss of LDL receptors from the cell surface which is attributed to an inhibition of receptor recycling; However, chloroquine is much less efficient than monensin since a three-fold greater concentration of chloroquine is required for only 50 % of reduction of cell-surface LDL receptors compared to monensin (Basu *et al.*, 1981). As LDL receptor has been described as a HCV putative receptor (Monazahian *et al.*, 1999), we can hypothesize that the difference of pseudotypes fusion we observed after treatment with chloroquine compared to monensin, may be due to a difference in the number of LDL receptors available at the cell surface for viral binding, rather than a less efficient modification of endosomal pH by chloroquine.

In order to better characterize HCV entry into host cells, we have used inhibitors of the different endocytic pathways. To inhibit clathrin-mediated endocytosis, we have used brefeldin A, which is known to inhibit GTPases implicated in the secretory pathway (Brodsky *et al.*, 2001). We also tested the effects of chlorpromazine, a calmodulin antagonist, as calmodulin is implicated in the formation of clathrin-coated pits and for actin microfilaments in coated vesicle formation (Salisbury *et al.*, 1980). Chlorpromazine was extensively employed to study virus entry and by this way, it has been possible to

demonstrate the role of clathrin-mediated endocytosis in the uptake of influenza virus (Krizanova *et al.*, 1982) or of the polyomavirus (Pho *et al.*, 2000) for example. Our results show that pseudotypes fusion with Huh-7 cells and with primary human hepatocytes was strongly reduced after treatment with BFA or chlorpromazine, suggesting that HCV entry into host cells may occur via clathrin-dependent endocytosis. As lipid rafts, principally constituted of cholesterol, are associated with caveolae formation, we have tested the effect of filipin (Orlandi & Fishman, 1998), a sterol-binding drug, on pseudotypes fusion. After such treatment, viral fusion was only partially inhibited with Huh-7 cells and primary hepatocytes, indicating that caveolae-dependent endocytosis could be an alternative way used by pseudotypes to enter host cells. Similar results were obtained when cells were treated with cytochalasin D which prevents polymerization of actin filaments. This observation suggests that macropinocytosis may not a major entry pathway for pseudotypes.

The fact that pseudotypes can easily fuse with Huh-7 cells and primary hepatocytes suggest the presence of high affinity receptor molecule(s) on these two cell types whereas these molecules may not be present on the surface of BHK-21 and HepG2 cells as shown by our results. At this time, HCV receptor on host cells is still unknown. The tetraspanin CD81 was the first molecule proposed to be HCV receptor (Pileri *et al.*, 1998, Flint *et al.*, 1999a, b, 2000). However, its ubiquitous expression does not explain the restraint tropism of HCV and it seems that interaction of HCV with CD81 does not lead to internalization of the virus (Petracca *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2003). Our results show that fusion of pseudotypes is more efficient on Huh-7 cells than on HepG2 cells. The fact that HepG2 cells do not express CD81 may explain in part this difference: binding of pseudotypes to CD81 may allow the particle to move closer to another receptor responsible for internalization. Another candidate receptor is the rLDL. It is now established that rLDL are

involved in HCV adsorption (Wunschmann *et al.*, 2000, Germei *et al.*, 2002), Triyatni *et al.*, 2002). This interaction may play a role in internalization since treatment of HepG2 cells with anti-rLDL can inhibit HCV endocytosis (Agnello *et al.*, 1999). However, when E1 and E2 are expressed at the surface of CHO cells, such treatment did not prevent fusion with HepG2 target cells (Takikawa *et al.*, 2000). It has recently been shown that clathrin-coated pits are implicated in cellular uptake of LDL in human fibroblasts (Hrboticky *et al.*, 2002). Our results are in agreement with this finding since we have observed that most of pseudotyped particles enter hepatic cells, which are known to express high level of rLDL, via clathrin-mediated endocytosis. The scavenger receptor class B type I (SR-BI) has been described as a potential receptor for HCV (Scarselli *et al.*, 2002). SR-BI is highly expressed in liver hepatocytes where it binds and internalizes HDL (high density lipoprotein) (Babitt *et al.*, 1997) via a non-clathrin-dependent endocytosis (Silver *et al.*, 2001). This new candidate receptor was identified at the surface of HepG2 cells which do not express CD81 and its natural localization in lipid raft membranes (Babitt *et al.*, 1997) suggests that internalization of its ligand may occur via a caveolae-dependent pathway. Our own results showed about 40 % decrease of pseudotypes fusion when this pathway was inhibited by filipin, suggesting that caveolae-dependent endocytosis may be, at least in part, implicated in viral entry.

Recently, a new HCV putative receptor was described on primary human hepatocytes and on HepG2 cells (Saunier *et al.*, 2003). The transfection of a non-permissive mouse fibroblast cell line (3T3-L1) with the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) conferred HCV binding and entry. However, our results showed a large difference of fusion of pseudotypes between primary human hepatocytes and HepG2, suggesting that ASGP-R alone is not sufficient to confer susceptibility to infection.

We have demonstrated that VSV/HCV pseudotypes enters host cells via a pH-dependent mechanism in which the endosome-lysosome system is involved, thus confirming previous studies. This report brings new informations concerning the early steps of HCV infection. In this study, we have shown that pseudotypes enter host cells via clathrin-mediated endocytosis. However, our results also indicate that a small part of pseudotypes could use caveolae-dependent pathway and macropinocytosis as alternative entry pathways. Our results are in agreement with the description of the putative receptors for HCV. Nevertheless, further studies are needed to fully understand HCV entry in order to help in the development new therapies against HCV infection.

## Reference List

**Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q.-X. (1999).** Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**, 12766-12771.

**Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L., and Kuo, G. (1989).** Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N.Engl.J.Med.* **321**, 1494-1500.

**Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S., and Krieger, M. (1997).** Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *The journal of biological chemistry* **272**, 13242-13249.

**Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981).** Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* **24**, 493-502.

**Blumenthal, R., Gallo, S. A., Viard, M., Raviv, Y., and Puri, A. (2002).** Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem.Phys.Lipids* **116**, 39-55.

**Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001).** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**, 517-568.



**Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.

**Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000).** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 3623-3633.

**Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Kieny, M. P., and Martin, J. P.** Use of non-replicative recombinant adenoviruses as a novel approach to generate pure and reproducible VSV/HCV pseudotyped particles. *In preparation*.

**Dahlberg, J. E. (1974 ).** Quantitative electron microscopic analysis of the penetration of VSV into L cells. *Virology*.**58**, 250-262

**David, P., Viollon, C., Alexandre, E., Azimzadeh, A., Nicod, L., Wolf, P., Jaeck, D., Boudjema, K., and Richert, L. (1998).** Metabolic capacities in cultured human hepatocytes obtained by a new isolating procedure from non-wedge small liver biopsies. *Hum.Exp.Toxicol.* **17**, 544-553.

**Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697-704.

**Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994).** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**, 6147-6160.

**Flamand, A. and Bishop, D. H. (1973).** Primary in vivo transcription of vesicular stomatitis virus and temperature-sensitive mutants of five vesicular stomatitis virus complementation groups. *Journal of Virology* **12**, 1238-1252.

**Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., and McKeating, J. A. (1999a).** Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *Journal of Virology* **73**, 6235-6244.

**Flint, M. and McKeating, J. A. (1999).** The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *Journal of General Virology* **80**, 1943-1947.

**Flint, M., J. M. Thomas, C. M. Maidens, C. Shotton, S. Levy, W. S. Barclay, and J. A. McKeating. (1999b).** Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **73**:6782-6790.

**Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C. M., Harrop, R., Guile, G. R., Borrow, P., and McKeating, J. A. (2000).** Functional Characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **74**, 702-709.

**Flint, M. and McKeating, J. A. (2000).** The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Reviews in Medical Virology* **10**, 101-117.

**Fredericksen, B. L. and Whitt, M. A. (1995).** Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *Journal of Virology* **69**, 1435-1443.

**Gallione, C. J. and Rose, J. K. (1985).** A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *Journal of Virology* **54**, 374-382.

**Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P., and Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J.Med.Virol.* **68**, 206-215.

**Hrboticky, N., Feldmeer, T., Essler, M., Wiedemann, A., and Aepfelbacher, M. (2002).** Involvement of the GTPase Rho in the cellular uptake of low density lipoprotein by human skin fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* **1580**, 123-132.

**Krizanova, O., Ciampor, F., and Veber, P. (1982).** Influence of chlorpromazine on the replication of influenza virus in chick embryo cells. *Acta Virol.* **26**, 209-216.

**Lanford, R. E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C., and Kim, J. (1993).** Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* **197**, 225-235.

**Marsh, M. and Helenius, A. (1980).** Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J.Mol.Biol.* **142** , 439-454.

**Marsh, M. and Pelchen-Matthews, A. (2000).** Endocytosis in viral replication. *Traffic.* **1**, 525-532.

**Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981).** Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J.Cell Biol.* **91**, 601-613.

**Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1982).** Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J.Mol.Biol.* **156**, 609-631.

**Meyer, K., Basu, A., and Ray, R. (2000).** Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* **276**, 214-226.

**Miller, D. K, and Lenard, J. (1980).** Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by spike glycoprotein. Evidence for an intracellular, G protein-requiring step. *J Cell Biol.* **84**, 430-437.

**Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999).** Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J.Med.Virol.* **57**, 223-229.

**Norkin, L. C. (1999).** Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol.Rev.* **168**, 13-22.

**Op De Beeck, A., Cocquerel, L., and Dubuisson, J. (2001).** Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of General Virology* **82**, 2589-2595.

**Orlandi, P. A. and Fishman, P. H. (1998).** Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J.Cell Biol.* **141**, 905-915.

**Parton, R. G. and Lindsay, M. (1999).** Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol.Rev.* **168**, 23-31.

**Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S., and Grandi, G. (2000).** Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *Journal of Virology* **74**, 4824-4830.

**Pho, M. T., Ashok, A., and Atwood, W. J. (2000).** JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **74**, 2288-2292.

**Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998).** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.

**Salisbury, J. L., Condeelis, J. S., and Satir, P. (1980).** Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *J. Cell Biol.* **87**, 132-141.

**Sasaki, M., Yamauchi, K., Nakanishi, T., Kamogawa, Y., and Hayashi, N. (2003).** In vitro binding of hepatitis C virus to CD81-positive and -negative human cell lines. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 74-79.

**Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., and Kohn, L. D. (2003).** Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of Virology* **77**, 546-559.

**Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017-5025.

**Schnitzer, T. J., Dickson, C., and Weiss, R. A. (1979).** Morphological and biochemical characterization of viral particles produced by the tsO45 mutant of vesicular stomatitis virus at restrictive temperature. *Journal of Virology* **29**, 185-195.

**Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R. (2002).** Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology* **83**, 1535-1545.

**Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X., and Tall, A. R. (2001).** High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *The journal of biological chemistry* **276**, 25287-25293.

**Stan, R. V. (2002).** Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc.Res.Tech.* **57**, 350-364.

**Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F. M., Tinari, A., Donelli, G., and Orsi, N. (1987).** Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *Journal of General Virology* **68 ( Pt 2)**, 387-399.

**Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000).** Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 5066-5074.

**Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002).** Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol.Biol.Cell* **13**, 238-250.

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

**Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A. R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L. D., and Liang, T. J. (2002).** Interaction of hepatitis C virus-like particles and

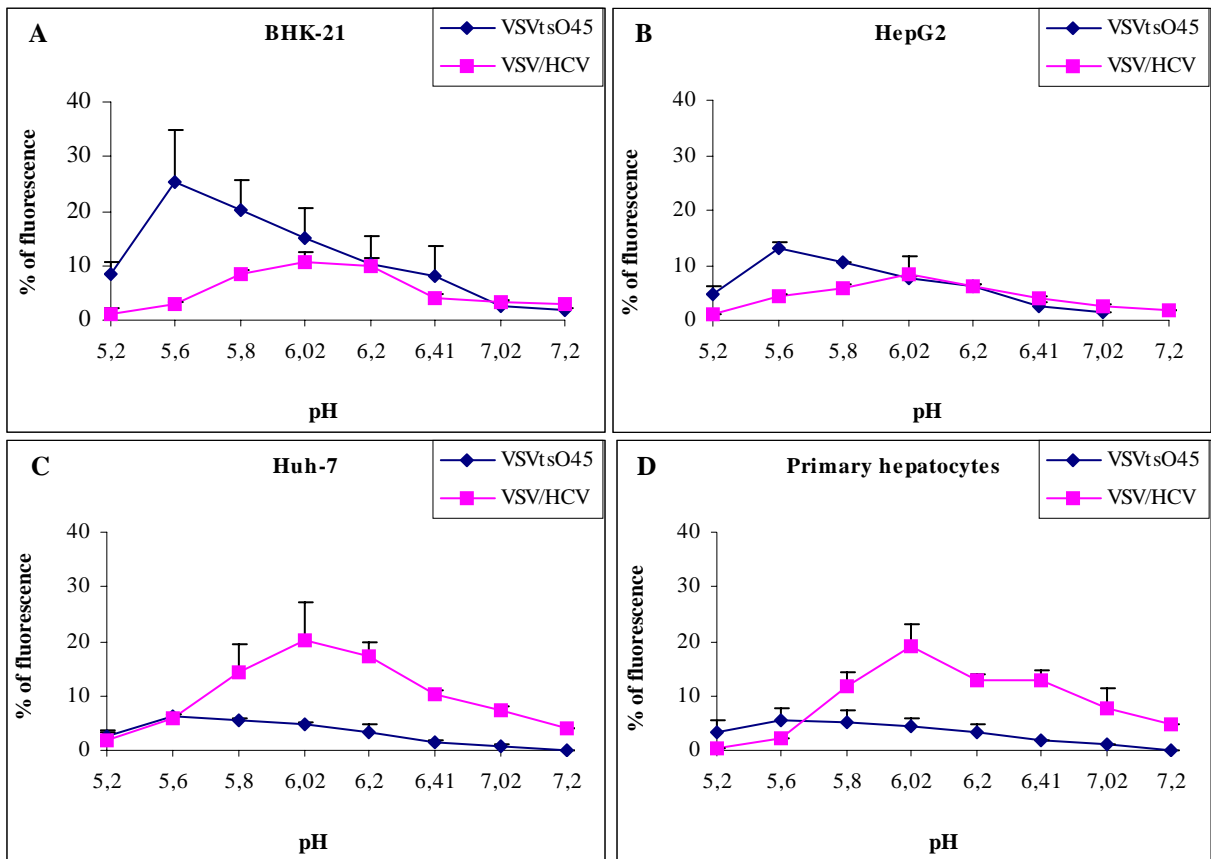
cells: a model system for studying viral binding and entry. *Journal of Virology* **76**, 9335-9344.

**White, J. M. (1990).** Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu.Rev.Physiol* **52**, 675-697.

**Whitt, M. A., Chong, L., and Rose, J. K. (1989).** Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *Journal of Virology* **63**, 3569-3578.

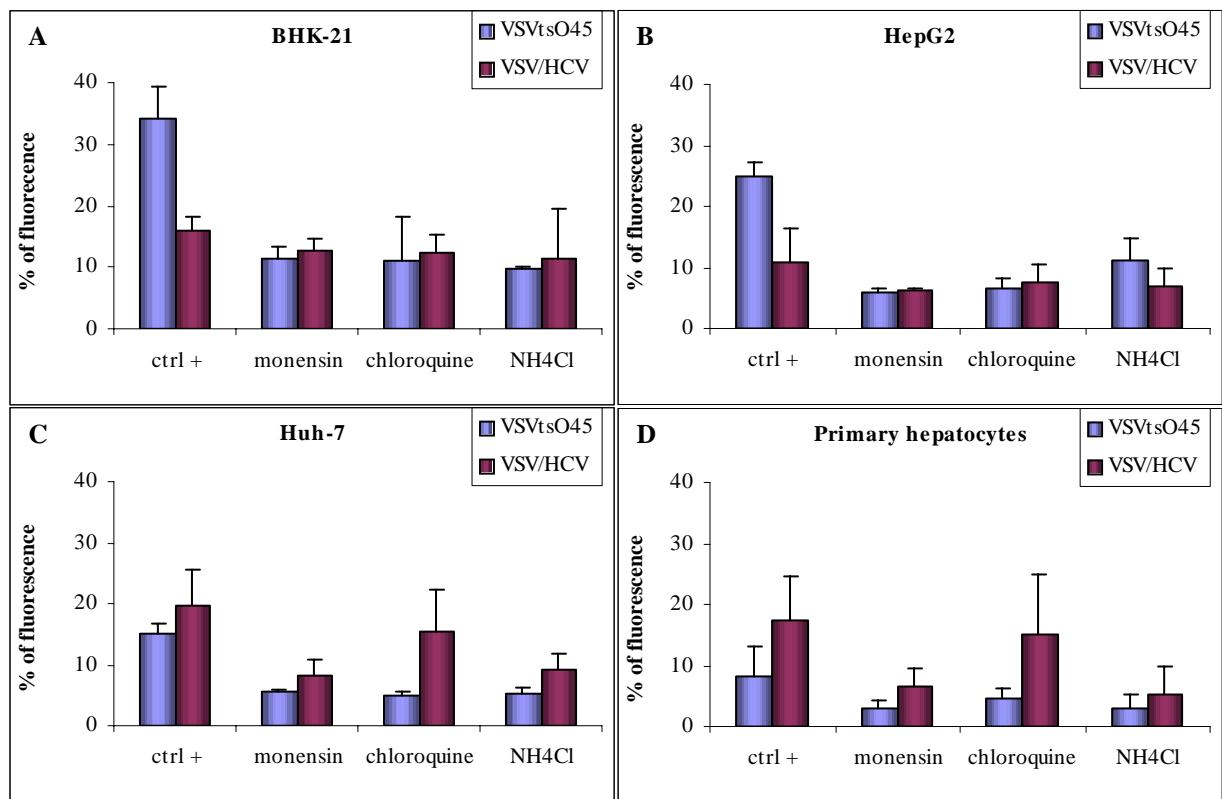
**Whitt, M. A., Zagouras, P., Crise, B., and Rose, J. K. (1990).** A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal of Virology* **67**, 4907-4913.

**Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N., and Stapleton, J. T. (2000).** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Virology* **74**, 10055-10062.

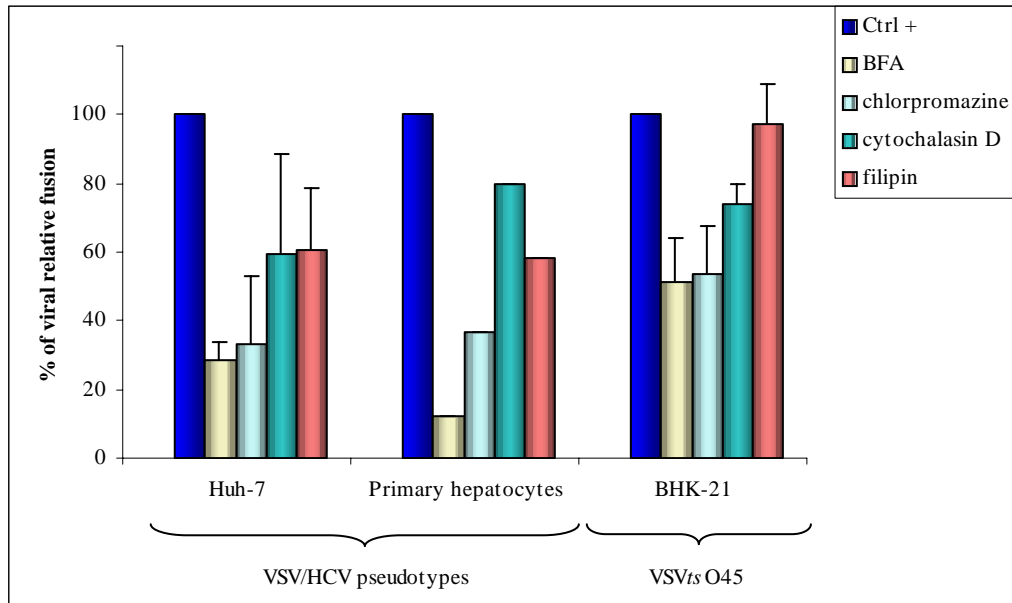


**Figure 1.** Determination of the optimal pH required for VSVtsO45 and VSV/HCV pseudotypes fusion with target cells. Viral particles were labeled as described in Materials and Methods. Cells were treated with PBS adjusted at different pH before viral adsorption performed at 4 °C. Cells were then incubated at 37 °C to allow viral entry for 30 min and washed before fixation with 1.5 % formaldehyde. Emission of fluorescence due to viral fusion was measured by flow cytometry.





**Figure 2.** Effects of endosomal pH modulators on VSV $tsO45$  and VSV/HCV pseudotypes fusion with target cells. Cells were treated with PBS at pH 5.6 or 6.02 as positive controls for VSV $tsO45$  and VSV/HCV pseudotypes respectively, with 10  $\mu$ M monensin, 100  $\mu$ M chloroquine or 300  $\mu$ M  $NH_4Cl$ , before viral adsorption. Cells were washed before fixation with 1.5 % formaldehyde. Fusion was measured by emission of fluorescence by flow cytometry.



**Figure 3.** Effects of endocytosis inhibitors on VSVtsO45 and VSV/HCV pseudotypes fusion. Cells were treated with PBS at pH 5.6 or 6.02 as positive controls for VSVtsO45 and VSV/HCV pseudotypes respectively, with 10  $\mu$ M BFA, 100  $\mu$ M chlorpromazine, 10  $\mu$ M cytochalasin D or 0.05 % filipin. Cells were washed before fixation with 1.5 % formaldehyde. Fusion was measured by emission of fluorescence by flow cytometry.

Pathway	Inhibitor	Target
Clathrin-dependent	Brefeldin A (BFA)	Inhibition of GTPases implicated in intracellular transport
Caveolae-dependent	Chlorpromazine Filipin	Calmodulin antagonist sterol-binding
Macropinocytosis	Cytochalasin D	Depolymerisation of actin filaments

**Table 1.** Endocytosis inhibitors used in this study and their targets.

## NOTE

Afin d'en faciliter la lecture, les légendes des figures des articles ont été placées en-dessous de celle-ci

## Discussion

# Discussion

Depuis sa découverte et le clonage de son génome en 1989, le virus de l'hépatite C n'a cessé d'être un défi pour les virologistes. Le fait qu'aucun système cellulaire ne soit efficace pour propager ce virus a poussé les chercheurs à développer de nouvelles approches pour son étude.

Afin d'élucider une partie des mécanismes impliqués dans la pénétration du VHC dans la cellule hôte, nous avons choisi de produire des virus pseudotypes VSV/VHC préférentiellement à des virus chimères. En effet, l'utilisation de virus chimères est délicate en raison des manipulations génétiques réalisées pour leur obtention et ces particules doivent être manipulées en confinement de type L3. Dans le cas des virus pseudotypes, aucune manipulation génétique n'est nécessaire pour leur obtention, ce qui rend leur utilisation possible en confinement L2. De plus, ces particules virales sont considérées comme étant des particules suicides puisque dès le premier cycle d'infection, elles perdent leur enveloppe et redonnent naissance au virus d'origine (le virus de la stomatite vésiculaire dans le cadre de notre étude).

Le choix du virus hôte est donc très important pour la production de particules pseudotypes et doit répondre à plusieurs critères : il doit pouvoir se multiplier à haut titre, il doit être peu ou pas pathogène pour l'homme et finalement, il doit être capable d'intégrer une enveloppe autre que la sienne. Notre choix s'est porté sur le virus de la stomatite vésiculaire qui présente toutes les propriétés énoncées précédemment. Ce virus, membre de la famille des *Rhabdoviridae*, a largement été utilisé pour l'analyse de glycoprotéines d'enveloppe du Borna disease virus (Perez *et al.*, 2001), du virus Ebola (Takada *et al.*, 1997), du HTLV-1 (Okuma *et al.*, 2001), du virus de la rougeole (Tatsuo *et al.*, 2000) et du

VIH (Bartz & Vodicka, 1997, Johnson *et al.*, 1997, Haglund *et al.*, 2000) pour ne citer qu'eux.

Le deuxième paramètre essentiel lors de la production de virus pseudotypes est l'expression des glycoprotéines d'intérêt dans la cellule. Dans le cas du VHC, plusieurs techniques d'obtention de pseudotypes ont été décrites. Dans le système développé par l'équipe de Ray (Lagging *et al.*, 1998), les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sont exprimées dans la cellule par transfection d'un plasmide contenant les gènes codant E1 et E2 sous contrôle d'un promoteur T7, et par co-infection avec un virus de la vaccine recombinant exprimant la T7 polymérase, puis les pseudotypes sont obtenus par sur-infection par une souche thermosensible du VSV (VSV<sub>ts</sub>O45). Ce système permet une forte expression de E1 et E2, mais présente un inconvénient majeur, puisque les pseudotypes obtenus sont contaminés par des virions vaccine et doivent être traités par des anticorps neutralisants dirigés contre le virus de la vaccine ou purifiés sur filtre 0,1 µm. Dans l'approche développée par l'équipe de Miyamura (Matsuura *et al.*, 2001), les glycoprotéines E1 et E2 sont exprimées de façon constitutive par des lignées stables. Les pseudotypes sont obtenus en infectant ces lignées stables par un VSV dont le gène codant la glycoprotéine d'enveloppe G a été délété et remplacé par celui codant la protéine fluorescente verte (EGFP). Ce virus, appelé VSVΔG, est propagé par infection de cellules exprimant la glycoprotéine G du VSV de façon transitoire. Ce virus a également été utilisé par l'équipe de Rose (Buonocore *et al.*, 2002) pour la fabrication de virus recombinants VSV qui expriment les glycoprotéines d'enveloppe du VHC. Lors de cette étude, les auteurs ont montré que ces virus portent des traces de protéines G résiduelles, dues au système utilisé pour propager le VSVΔG. Il n'est donc pas impossible de supposer que le virus utilisé par l'équipe de Miyamura soit également porteur de glycoprotéines G résiduelles.

Afin de s'abolir des problèmes de contaminations virale et protéique lors de la fabrication de nos pseudotypes, nous avons opté pour l'utilisation de la souche thermosensible VSV<sub>ts</sub>O45 et d'adénovirus recombinants non répliatifs pour l'expression des glycoprotéines E1 et E2 du VHC.

Le VSV bourgeonnant à la membrane plasmique, nous avons du modifier l'adressage des glycoprotéines E1 et E2 du VHC, lesquelles sont naturellement localisées dans le réticulum endoplasmique. Des études ont montré que des formes tronquées de E1 à l'acide aminé 311 et E2 à l'acide aminé 661 sont efficacement sécrétées (Matsuura *et al.*, 1994, Michalak *et al.*, 1997). Nous avons donc fusionné ces formes sécrétées aux 50 acides aminés C-terminaux de la glycoprotéine G du VSV correspondants au domaine transmembranaire et à la queue cytoplasmique (TmG), ces séquences jouant le rôle de signal d'ancrage à la membrane plasmique et permettant l'incorporation de E1 et E2 dans les particules en bourgeonnement (Whitt *et al.*, 1989, Owens & Rose, 1993, Robinson & Whitt, 2000). Les gènes de fusion E1-TmG et E2-TmG ont été obtenus par la technique de triple PCR, puis ont été insérés dans le génome de l'adénovirus de type 5 sous contrôle d'un promoteur CMV afin d'assurer un bon niveau d'expression des protéines recombinantes. Nous avons également fusionné la protéine chimérique E1-TmG à la protéine fluorescente verte (EGFP) afin d'en faciliter sa détection. Le génome de l'adénovirus est délété de sa région précoce E1, ce qui a pour conséquence de le rendre non répliatif. La propagation de cet adénovirus ne peut être réalisée que sur une lignée de complémentation (la lignée HEK 293) qui exprime la région E1 de façon constitutive. Nous avons ainsi généré deux adénovirus recombinants non répliatifs (AdIV521 et AdIV514) exprimant EGFP-E1-TmG et E2-TmG respectivement. Des expériences de radio-immunoprécipitation nous ont permis de vérifier que les protéines de fusion EGFP-E1-TmG et E2-TmG étaient correctement exprimées dans des cellules infectées par les



adénovirus recombinants correspondants. Lors de cette expérience, nous avons pu détecter deux formes de la protéine E2-TmG : une forme à 70 kDa et une autre à 100 kDa. La forme de poids moléculaire élevé correspond à une forme de E2-TmG porteuse de sucres complexes acquis lors du passage dans l'appareil de Golgi (Dubuisson *et al.*, 1994).

Nous avons ensuite vérifié la localisation membranaire des protéines de fusion EGFP-E1-TmG et E2-TmG par des expériences de cytométrie en flux. Des cellules Huh-7 infectées par AdIV521 ou AdIV514 ont été marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre E1 et E2. Les résultats obtenus montrent que les protéines EGFP-E1-TmG et E2-TmG sont accessibles aux anticorps même en l'absence de perméabilisation préalable. Nous avons donc pu conclure que nos deux protéines de fusion sont bien localisées à la membrane plasmique de la cellule.

Cette première étape de caractérisation des des protéines de fusion exprimées par l'intermédiaire des adénovirus recombinants étant franchie, nous avons ensuite mis au point un protocole de fabrication des virus pseudotypes. Nous avons pu déterminer que les cellules BHK-21 doivent être infectées par AdIV521 et AdIV514 à une m.o.i. de 50 pendant 5 h à 37 °C, puis sur-infectées par le VSV<sub>ts</sub>O45 à une m.o.i. de 2,5 pendant 24 h à 40,5 °C. Les surnageants sont ensuite récupérés puis ultracentrifugés sur un coussin de glycérol 25 %. Les culots sont repris dans du PBS et titrés par plages de lyse. Nous avons ainsi pu obtenir des titres viraux de l'ordre de 10<sup>5</sup> pfu/ml (contre 10<sup>4</sup> pfu/ml par la technique décrite par Lagging *et al.*). Nous avons réalisé ces titrages sur cellules BHK-21, Huh-7 et HepG2 mais nous n'avons pas observé de différences significatives du titre viral obtenu selon la lignée cellulaire utilisée. Nous avons également montré que ces particules étaient capables d'infecter des lignées cellulaires humaines d'origine hépatique ainsi que des hépatocytes primaires humains.

Nous avons ensuite entrepris de démontrer la présence de E1 et E2 à la surface des particules obtenues par la triple infection décrite précédemment. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps neutralisants spécifiques de la glycoprotéine G du VSV. Le traitement de nos particules par ces anticorps n'a pas diminué leur pouvoir infectieux, contrairement à ce qui a été observé avec le VSV<sub>tsO45</sub>. Le fait que les pseudotypes ne soient pas neutralisés par des anticorps spécifiques de la glycoprotéine G nous indique que ces particules ne portent pas de protéine G résiduelle à leur surface et que l'infection par ces particules a lieu par l'intermédiaire de E1 et E2. Nous avons pu observer une augmentation du pouvoir infectieux des pseudotypes sur hépatocytes primaires humains, et à moindre échelle sur les lignées hépatiques testées, suite au traitement par les anticorps neutralisant le VSV. Nous pouvons supposer que la fixation des anticorps neutralisants, qui n'ont pas reconnu les pseudotypes, aux récepteurs Fc présents à la surface des hépatocytes, induit des modifications cellulaires qui rendent ces cellules plus susceptibles à l'infection par les pseudotypes. Cependant, cette hypothèse reste à être vérifiée et des expériences sont en cours dans ce but.

Les virus pseudotypes produits par l'équipe de Ray (Lagging *et al.*, 1998) ont montré qu'ils étaient plus infectieux sur cellules BHK-21 alors que ceux produits par l'équipe de Myiamura (Matsuura *et al.*, 2001) présentent un pouvoir infectieux très élevé sur cellules HepG2. Récemment, des virus VSV recombinants qui expriment les glycoprotéines d'enveloppe du VHC à la place de la glycoprotéine G du VSV, n'ont montré aucun pouvoir infectieux ni sur cellules HepG2, ni sur hépatocytes primaires humains (Buonocore *et al.*, 2002) bien que les protéines chimériques utilisées dans cette étude soient les mêmes que celles décrites par Matsuura *et al.* Nos propres résultats indiquent que nos pseudotypes sont capables d'infecter des lignées cellulaires variées incluant les cellules BHK-21, HepG2 et Huh-7, ainsi que des hépatocytes primaires

humains. Une des hypothèses émises par Buonocore et collaborateurs est que la différence de tropisme observée entre les pseudotypes de Ray et ceux de Myiamura pourrait s'expliquer par le système utilisé pour exprimer les glycoprotéines E1 et E2 du VHC. En effet, dans le système décrit par Lagging *et al.*, les glycoprotéines modifiées E1 et E2 sont exprimées de façon transitoire alors que dans le système développé par Matsuura *et al.*, ces deux protéines sont exprimées dans des lignées stables CHO. Nous ne pensons pas que cette explication soit suffisante puisque dans notre système, bien que E1 et E2 soient exprimées de façon transitoire, nos pseudotypes sont capables d'infecter aussi bien des cellules d'origine hépatique ou non. Il nous paraît cependant important de déterminer la cause de cette différence de tropisme afin de comparer les différents systèmes et de pouvoir juger lequel permet la fabrication de l'outil le plus approprié pour l'étude des phases précoces du cycle du VHC.

Dans le cadre de notre étude, nous avons fabriqué des virus pseudotypes afin d'étudier la pénétration du VHC dans les cellules hôtes, et plus précisément l'étape de fusion qui permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule infectée. Pour ces études de fusion, nous avons utilisé une sonde lipidique fluorescente pour marquer nos virus. L'octadécyl-rhodamine B (R18) peut être incorporé dans les membranes virales où la fluorescence est « quenchée ». Lors de la fusion, la sonde va se répartir dans la membrane plasmique de la cellule cible et la fluorescence va être libérée. L'émission de ce signal peut être facilement détectée en cytométrie en flux. Nous avons tout d'abord validé notre technique par l'utilisation de VSV $\Delta$ tsO45 marqué au R18. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le VSV $\Delta$ tsO45 fusionne à pH acide (avec une fusion maximum à pH 5,6). L'utilisation de bases faibles, de carboxyl-ionophores et d'inhibiteurs d'endocytose nous a permis de confirmer que la pénétration du VSV $\Delta$ tsO45 se faisait par l'intermédiaire de l'endosome et plus précisément par une voie clathrine-

dépendante. Nous avons ainsi pu confirmer les données de la littérature (Superti *et al.*, 1987, Fredericksen & Whitt, 1995) et valider notre technique d'étude de la fusion pour l'appliquer aux pseudotypes VSV/VHC.

Le premier test a consisté à déterminer le pH optimal requis pour la fusion des pseudotypes. Nous avons donc mesuré la fusion de nos virus marqués au R18 à la cellule hôte dans différentes conditions de pH. Ceci nous a permis de montrer que la fusion des pseudotypes était maximale à pH 6,2. Dans nos constructions, nous avons fusionné les ectodomains de E1 et E2 au 50 acides aminés C-terminaux de la glycoprotéine G du VSV. Il a été montré que le peptide de fusion du VSV est localisé dans la région N-terminale de la glycoprotéine G, plus précisément entre les acides aminés 117 et 136 (Whitt *et al.*, 1990, Fredericksen & Whitt, 1995). Le fait que cette région ne soit pas présente dans nos constructions indique que la fusion observée avec les pseudotypes se fait bien par E1 et/ou E2.

Récemment, l'équipe de Myiamura a mis au point un test permettant d'étudier les propriétés de fusion des glycoprotéines E1 et E2 du VHC (Takikawa *et al.*, 2000). Dans ce test, E1 et E2 sont exprimées de façon constitutive à la surface de cellules CHO. Ces lignées stables expriment également la T7 ARN polymérase de façon transitoire. Ces cellules sont ensuite mises en co-culture avec des cellules cibles transfectées par un plasmide codant le gène reporter de la luciférase sous contrôle du promoteur T7. La fusion est ensuite mesurée par l'expression de la luciférase lors de la co-culture. Cette étude a permis de montrer l'importance du pH sur l'activité de fusion de E1 et E2 en suggérant que le VHC entre dans la cellule hôte par une voie dépendante du pH et que des changements conformationnels de E1 et/ou E2 lors du passage dans l'endosome permettraient la fusion des membranes virale et cellulaire nécessaire à la libération de la nucléocapside dans le

cytoplasme. Nos résultats concernant la détermination du pH optimal requis pour la fusion des pseudotypes à la cellule hôte confirment cette hypothèse.

Une autre équipe s'est penchée sur les mécanismes d'entrée du VHC dans la cellule hôte en utilisant des virus pseudotypes pour leur étude (Meyer *et al.*, 2000). Les auteurs ont pu observer que l'infection par les pseudotypes était inhibée lorsque les cellules étaient pré-traitées par du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou des inhibiteurs de la  $\text{H}^+$ -ATPase, substances qui ont pour effet d'augmenter le pH de l'endosome. Ces résultats suggèrent que l'entrée du VHC dans la cellule hôte se fait par l'endosome. Nous avons pu confirmer cette hypothèse lors de nos propres expériences de fusion. En effet, lorsque les cellules sont pré-traitées par du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou de la monensine, nous avons pu observer une forte diminution de la fusion des pseudotypes aux cellules cibles, confirmant le passage de la particule virale par l'endosome lors de la pénétration. Nous n'avons pas observé de réduction significative de la fusion des pseudotypes suite à un traitement par la chloroquine. En plus de leur action sur le pH endosomal, la chloroquine et la monensine provoquent une diminution du nombre de récepteurs LDL présents à la surface de la cellule en inhibant leur recyclage. Cependant, la chloroquine s'est révélée être moins efficace que la monensine puisqu'une concentration trois fois supérieure de chloroquine est nécessaire pour réduire de seulement 50 % le nombre de récepteurs LDL présents à la surface de la cellule, comparé à la monensine (Basu *et al.*, 1981). Le récepteur LDL étant décrit comme récepteur potentiel du VHC (Monazahian *et al.*, 1999), nous pensons donc que la différence de fusion observée serait liée à un nombre de récepteurs LDL disponibles plus important pour la fixation des pseudotypes après traitement à la chloroquine par rapport à un traitement à la monensine, plutôt qu'à une mauvaise modification du pH endosomal par la chloroquine.

Nous avons ensuite entrepris de mieux caractériser la voie d'endocytose utilisée par les pseudotypes lors de la pénétration dans la cellule hôte. Pour cela, nous avons utilisé des

inhibiteurs des différentes voies d'endocytose : la bréfeldine A (BFA) et la chlorpromazine pour la voie clathrine-dépendante, la cytochalasine D pour la macropinocytose et la filipine pour la voie cavéole-dépendante. Nous avons pu observer que, après traitement par la BFA et la chlorpromazine, la fusion est inhibée de 60 à 70 % sur cellules Huh-7 et jusqu'à 80 % sur hépatocytes primaires humains. Ces résultats indiquent que l'endocytose clathrine-dépendante pourrait être une voie d'entrée privilégiée pour le VHC. Cependant, nous avons également pu observer une faible diminution de la fusion après traitement par la cytochalasine D et par la filipine, ce qui suggère que seule une faible quantité de pseudotypes pénétrerait dans la cellule par macropinocytose ou par une voie cavéole-dépendante.

A notre connaissance, cette étude est la première à apporter de nouvelles informations concernant le mode de pénétration du VHC dans la cellule hôte. Il convient néanmoins de rester prudent à la vue de ces résultats étant donné que les inhibiteurs utilisés n'ont pas une spécificité d'action maximale.

Au cours de nos tests, nous avons pu observer que la fusion des pseudotypes était plus importante sur cellules Huh-7 et hépatocytes primaires que sur cellules BHK-21 et HepG2, suggérant la présence d'un récepteur de plus forte affinité sur ces deux types cellulaires. Même si le récepteur spécifique du VHC n'est pas encore connu, les données de la littérature nous apportent certains éléments de réponse. Le fait que les cellules HepG2 n'expriment pas CD81 pourrait en partie expliquer la faible fusion observée sur ces cellules. En effet, même si la fixation de E2 à CD81 n'entraîne pas l'internalisation de la particule virale (Sasaki *et al.*, 2003), cette interaction pourrait permettre le rapprochement de la particule d'un autre récepteur, qui lui, serait responsable de son internalisation. Un autre candidat récepteur pour le VHC est le récepteur aux LDL (Wunschmann *et al.*, 2000, Germe *et al.*, 2002, Triyatni *et al.*, 2002). Il a récemment été montré que la clathrine était

impliquée dans l'endocytose du LDL, ligand naturel de ce récepteur, dans des fibroblastes humains (Hrboticky *et al.*, 2002). Le VHC étant tapissé de LDL, il est possible de supposer que ce virus utilise également la clathrine pour pénétrer dans la cellule. Les résultats que nous avons obtenus soutiennent cette hypothèse. En effet, nous avons pu observer que la principale voie d'entrée des pseudotypes dans la cellule hôte était dépendante de la clathrine. La description récente du récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) comme nouveau candidat à la fixation du VHC à la surface des hépatocytes (Saunier *et al.*, 2003) apporte une indication supplémentaire de l'implication de la clathrine dans la pénétration du VHC. En effet, il est bien connu que cette lectine, qui fixe les résidus galactose ou N-acétylgalactosamine N-terminaux des glycoprotéines, est internalisée par endocytose clathrine-dépendante (Stockert, 1995, Weigel & Yik, 2002).

Parmi les autres récepteurs potentiels du VHC, le scavenger receptor class B type I (SR-BI) est également un candidat intéressant (Scarselli *et al.*, 2002). Cette molécule est fortement exprimée à la surface des hépatocytes et son ligand naturel, le HDL (high density lipoprotein) est internalisé (Babitt *et al.*, 1997) par une voie non-dépendante de la clathrine (Silver *et al.*, 2001). Sa localisation cellulaire au niveau des radeaux lipidiques (Babitt *et al.*, 1997) suggère que l'internalisation du ligand se fait par une voie dépendante de la cavéole. Nos résultats ont montré que la fusion des pseudotypes était diminuée d'environ 40 % lorsque les cellules étaient traitées par la filipine, ce qui suggère un rôle de la cavéole dans la pénétration du VHC dans la cellule. Il est donc permis de penser que la fixation du VHC au SR-BI entraînerait son internalisation par endocytose cavéole-dépendante, mais cette hypothèse reste à démontrer.

**C**onclusion générale et

**P**erspectives



## Conclusion générale et perspectives

En raison de l'absence de système de culture cellulaire capable de propager le virus de l'hépatite C, peu de choses sont connues sur son cycle de réplication. Nous avons essayé d'apporter de nouvelles connaissances sur les étapes précoces de l'infection et plus précisément, sur la fusion et la pénétration du VHC dans la cellule hôte.

Pour cela, nous avons tout d'abord mis au point une nouvelle technique de fabrication de virus pseudotypes. Cette approche nous permet d'éviter les problèmes de contaminations virale et protéique évoqués précédemment. Nous sommes actuellement en train de tester la réactivité de nos pseudotypes vis à vis de différents sérums de patients chroniquement infectés par le VHC, ce qui nous permettra de compléter la caractérisation de nos pseudotypes. De plus, l'identification de sérums capables de neutraliser nos particules nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phases précoces de l'infection par le VHC.

Grâce à l'utilisation des pseudotypes, nous avons pu montrer que l'internalisation de ces particules se fait par endocytose, principalement médiée par la clathrine. Ces nouvelles données pourront permettre la mise au point de molécules antivirales innovantes qui font encore défaut à ce jour.

Finalement, nous avons développé un outil qui peut être utilisé aussi bien en recherche fondamentale dans l'étude des phases précoces de l'infection par le VHC, que dans des thématiques plus appliquées telles la vaccination pour la recherche d'anticorps neutralisants, ou le criblage de molécules antivirales.

## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q.-X. (1999).** Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**, 12766-12771.
- Aiken, C. (1997).** Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *Journal of Virology* **71**, 5871-5877.
- Aoubala, M., Holt, J., Clegg, R. A., Rowlands, D. J., and Harris, M. (2001).** The inhibition of cAMP-dependent protein kinase by full-length hepatitis C virus NS3/4A complex is due to ATP hydrolysis. *Journal of General Virology* **82**, 1637-1646.
- Arrieta, J. J., Rodriguez-Inigo, E., Ortiz-Movilla, N., Bartolome, J., Pardo, M., Manzarbeitia, F., Oliva, H., Macias, D. M., and Carreno, V. (2001).** In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am.J.Pathol.* **158**, 259-264.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S., and Krieger, M. (1997).** Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *The journal of biological chemistry* **272**, 13242-13249.
- Baker, D. E. (2001).** Pegylated interferons. *Rev.Gastroenterol.Disord.* **1**, 87-99.
- Bartz, S. R. and Vodicka, M. A. (1997). Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* **12**, 337-342.
- Bassett, S. E., Brasky, K. M., and Lanford, R. E. (1998).** Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *Journal of Virology* **72**, 2589-2599.

- Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981).** Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* **24**, 493-502.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T., and Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of Virology* **72**, 3827-3836.
- Baumert, T. F., Wellnitz, S., Aono, S., Satoi, J., Herion, D., Tilman, G. J., Pape, G. R., Lau, J. Y., Hoofnagle, J. H., Blum, H. E., and Liang, T. J. (2000).** Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **32**, 610-617.
- Bergamini, A., Cepparulo, M., Bolacchi, F., Araco, A., Tisone, G., Ombres, D., Rocchi, G., and Angelico, M. (2002).** Ribavirin increases mitogen- and antigen-induced expression of CD40L on CD4+ T cells in vivo. *Clin.Exp.Immunol.* **130**, 293-299.
- Bergmann, J. E., Tokuyasu, K. T., and Singer, S. J. (1981).** Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**, 1746-1750.
- Bishop, N. E. (1997).** An Update on Non-clathrin-coated Endocytosis. *Reviews in Medical Virology* **7**, 199-209.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A., and Roingeard, P. (2002).** Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *Journal of Virology* **76**, 4073-4079.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., and Rice, C. M. (2000).** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972-1974.
- Bonkovsky, H. L. and Mehta, S. (2001).** Hepatitis C: a review and update. *J.Am.Acad.Dermatol.* **44**, 159-182.
- Boritz, E., Gerlach, J., Johnson, J. E., and Rose, J. K. (1999).** Replication-competent rhabdoviruses with human immunodeficiency virus type 1 coats and green fluorescent protein: entry by a pH-independent pathway. *Journal of Virology* **73**, 6937-6945.

**Bourlet, T., Levy, R., Maertens, A., Tardy, J. C., Grattard, F., Cordonier, H., Laurent, J. L., Guerin, J. F., and Pozzetto, B. (2002).** Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 3252-3255.

**Bradley, D. W., Maynard, J. E., Popper, H., Cook, E. H., Ebert, J. W., McCaustland, K. A., Schable, C. A., and Fields, H. A. (1983).** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J.Infect.Dis.* **148**, 254-265.

**Bradley, D. W., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Schable, C. A., Ebert, J. W., and Maynard, J. E. (1985).** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* **88**, 773-779.

**Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001).** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**, 517-568.

**Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M., and Bartenschlager, R. (2002).** Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 14416-14421.

**Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M., and Rose, J. K. (2002).** Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **76**, 6865-6872.

**Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002).** Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **76**, 3720-3730. 2002.

**Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., and Marks, R. M. (1997).** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat.Med.* **3**, 866-871.

- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.-C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1999).** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **73**, 2641-2649.
- Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998).** A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology* **72**, 2183-2191.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000).** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 3623-3633.
- Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A., and Keller, F. (1995).** In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **76** ( Pt 10), 2485-2491.
- Damen, M. and Bresters, D. (1998).** Hepatitis C treatment. *Curr.Stud.Hematol.Blood Transfus.* 181-207.
- Dash, S., Halim, A. B., Tsuji, H., Hiramatsu, N., and Gerber, M. A. (1997).** Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am.J.Pathol.* **151**, 363-373.
- Davis, G. L. and Hoofnagle, J. H. (1986).** Interferon in viral hepatitis: role in pathogenesis and treatment. *Hepatology* **6**, 1038-1041.
- De Francesco, R., Urbani, A., Nardi, M. C., Tomei, L., Steinkuhler, C., and Tramontano, A. (1996).** A zinc binding site in viral serine proteinases. *Biochemistry* **35**, 13282-13287.

- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697-704.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C. E., Fang Fu, Z., and Koprowki, H.** In *Fields Virology* edited by Fields, B., Knipe, D. M., and Howley, P. 3<sup>rd</sup> edition. Lippincott-Raven publishers. Philadelphia, 1996.
- Dore, G. J. and Kaldor, J. M. (2000).** Detection of HCV RNA in semen. *Lancet* **356**, 1520.
- Dubuisson, J. (2000).** Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **242**, 135-148.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994).** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**, 6147-6160.
- Dubuisson, J. and Rice, C. M. (1996).** Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of Virology* **70**, 778-786.
- Eckert, D. M. and Kim, P. S. (2001).** Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu.Rev.Biochem.* **70**, 777-810.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002).** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* **76**, 5974-5984.
- Ezelle, H. J., Markovic, D., and Barber, G. N. (2002).** Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *Journal of Virology* **76**, 12325-12334.
- Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994).** Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* **68**, 3753-3760.

**Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (2001).** Cellular cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta* **1533** , 175-189.

**Flamand, A. (1970).** Genetic study of vesicular stomatitis virus: classification of spontaneous thermosensitive mutants into complementation groups. *Journal of General Virology* **8**, 187-195.

**Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C. M., Harrop, R., Guile, G. R., Borrow, P., and McKeating, J. A. (2000).** Functional Characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **74**, 702-709.

**Flint, M. and McKeating, J. A. (1999).** The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *Journal of General Virology* **80**, 1943-1947.

**Fredericksen, B. L. and Whitt, M. A. (1995).** Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *Journal of Virology* **69**, 1435-1443.

**Gallione, C. J. and Rose, J. K. (1985).** A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *Journal of Virology* **54**, 374-382.

**Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P., and Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J.Med.Virol.* **68**, 206-215.

**Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993).** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385-1395.

**Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., and Rowlands, D. J. (2003).** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* **535**, 34-38.



**Gunji, T., Kato, N., Hijikata, M., Hayashi, K., Saitoh, S., and Shimotohno, K. (1994).** Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. *Archives of Virology* **134**, 293-302.

**Haglund, K., Forman, J., Kräusslich, H.-G., and Rose, J. K. (2000).** Expression of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein precursor and envelope proteins from a vesicular stomatitis virus recombinant: high-level production of virus-like particles containing HIV envelope. *Virology* **268**, 112-121.

**Haruna, Y., Kanda, T., Honda, M., Takao, T., and Hayashi, N. (2001).** Detection of hepatitis C virus in the bile and bile duct epithelial cells of hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* **33**, 977-980.

**Hermida, M., Ferreira, M. C., Barral, S., Laredo, R., Castro, A., and Diz, D. P. (2002).** Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J.Virol.Methods* **101**, 29-35.

**Hewlett, L. J., Prescott, A. R., and Watts, C. (1994).** The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J.Cell Biol.* **124**, 689-703.

**Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993).** Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **67**, 4665-4675.

**Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H., and Lemon, S. M. (1999).** A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of Virology* **73**, 1165-1174.

**Hrboticky, N., Feldmeer, T., Essler, M., Wiedemann, A., and Aepfelbacher, M. (2002).** Involvement of the GTPase Rho in the cellular uptake of low density lipoprotein by human skin fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* **1580**, 123-132.

**Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E., and Moradpour, D. (2001).** The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**, 70-81.

**Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M. B., Macioce, G., Hassan, H. J., Ponzetto, A., Clementi, M., Peschle, C., and Carloni, G. (1997).** Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* **26**, 1328-1337.

**Iacovacci, S., Sargiacomo, M., Parolini, I., Ponzetto, A., Peschle, C., and Carloni, G. (1993).** Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res.Virol.* **144**, 275-279.

**Ishido, S., Fujita, T., and Hotta, H. (1998).** Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **244**, 35-40.

**Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K., and Yasui, K. (1996).** Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *Journal of General Virology* **77** ( Pt 5), 1043-1054.

**Ito, T., Tahara, S. M., and Lai, M. M. (1998).** The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *Journal of Virology* **72**, 8789-8796.

**Jain, J., Almquist, S. J., Shlyakhter, D., and Harding, M. W. (2001).** VX-497: a novel, selective IMPDH inhibitor and immunosuppressive agent. *J.Pharm.Sci.* **90**, 625-637.

**Johnson, J. E., Schnell, M. J., Buonocore, L., and Rose, J. K. (1997).** Specific targeting to CD4<sup>+</sup> cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *Journal of Virology* **71**, 5060-5068.

**Kato, N. (2000).** Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microbial and Comparative Genomics* **5**, 129-151.

**Kato, N., Ikeda, M., Mizutani, T., Sugiyama, K., Noguchi, M., Hirohashi, S., and Shimotohno, K. (1996).** Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplastic human hepatocytes. *Jpn.J.Cancer Res.* **87**, 787-792.

**Kato, N., Ootsuyama, Y., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Sekiya, H., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1992).** Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **189**, 119-127.

**Kim, D. W., Gwack, Y., Han, J. H., and Choe, J. (1997).** Towards defining a minimal functional domain for NTPase and RNA helicase activities of the hepatitis C virus NS3 protein. *Virus Res.* **49**, 17-25.

**Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C., and Caron, P. R. (1998).** Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.* **6**, 89-100.

**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., and 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.

**Koch, J. O. and Bartenschlager, R. (1999).** Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Journal of Virology* **73**, 7138-7146.

**Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996).** Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology* **70**, 3363-3371.

**Kong, L. K. and Sarnow, P. (2002).** Cytoplasmic Expression of mRNAs Containing the Internal Ribosome Entry Site and 3' Noncoding Region of Hepatitis C Virus: Effects of the 3' Leader on mRNA Translation and mRNA Stability. *Journal of Virology* **76**, 12457-12462.

**Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J., and Ray, R. (1998).** Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *Journal of Virology* **72**, 3539-3546.

**Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001).** Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol.Cell* **7**, 661-671.

**Lambot, M., Fretier, S., Op, D. B., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V., and Dubuisson, J. (2002).** Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *The journal of biological chemistry*.

**Lanford, R. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R., and Fuerst, T. R. (1994).** Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* **202**, 606-614.

**Laskus, T., Radkowski, M., Bednarska, A., Wilkinson, J., Adair, D., Nowicki, M., Nikolopoulou, G. B., Vargas, H., and Rakela, J. (2002).** Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *Journal of Virology* **76**, 10064-10068.

**Lechmann, M., Murata, K., Satoi, J., Vergalla, J., Baumert, T. F., and Liang, T. J. (2001).** Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* **34**, 417-423.

**Lee, H. M., Naor, J., Alhindi, R., Chinfook, T., Krajden, M., Mazzulli, T., and Rootman, D. S. (2001).** Detection of hepatitis C virus in the corneas of seropositive donors. *Cornea* **20**, 37-40.

**Leruez-Ville, M., Kunstmann, J. M., De Almeida, M., Rouzioux, C., and Chaix, M. L. (2000).** Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* **356**, 42-43.

**Lesburg, C. A., Radfar, R., and Weber, P. C. (2000).** Recent advances in the analysis of HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Curr.Opin.Investig.Drugs* **1**, 289-296.

**Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., and Barrera, J. D. C. (1999).** Vesicular stomatitis. *The Veterinary Journal* **157**, 239-260.

**Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. (2001).** Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *Journal of Virology* **75**, 1437-1449.

**Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997).** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* **71**, 8416-8428.

**Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999).** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.

**Love, R. A., Parge, H. E., Wickersham, J. A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E. W., Adachi, T., and Hostomska, Z. (1996).** The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* **87**, 331-342.

**Lu, H.-H. and Wimmer, E. (1996).** Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **93**, 1412-1417.

**Major, M. E., Mihalik, K., Fernandez, J., Seidman, J., Kleiner, D., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M., and Feinstone, S. M. (1999).** Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *Journal of Virology* **73**, 3317-3325.

**Major, M. E., Mihalik, K., Puig, M., Rehmann, B., Nascimbeni, M., Rice, C. M., and Feinstone, S. M. (2002).** Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *Journal of Virology* **76**, 6586-6595.

**Malet, I., Wychowski, C., Huraux, J.-M., Agut, H., and Cahour, A. (1998).** Yellow fever 5' noncoding region as a potential element to improve hepatitis C virus production through modification of translational control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 257-264.

**Manavi, M., Baghestanian, M., Watkins-Riedel, T., Battistutti, W., Pischinger, K., Schatten, C., Witschko, E., Hudelist, G., Hofmann, H., and Czerwenka, K. (2002).**

Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in normal cervical smears of HCV-seropositive patients. *Clin.Infect.Dis.* **35**, 966-973.

**Maniak, M. (2001).** Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1525**, 197-204.

**Marsh, M. and Helenius, A. (1980).** Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J.Mol.Biol.* **142** , 439-454.

**Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992).** Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology* **66**, 3225-3229.

**Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981).** Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J.Cell Biol.* **91**, 601-613.

**Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1982).** Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J.Mol.Biol.* **156**, 609-631.

**Matsuura, Y., Harada, T., Makimura, M., Sato, M., Aizaki, H., Suzuki, T., and Miyamura, T. (1994).** Characterization of HCV structural proteins expressed in various animal cells. *Intervirology* **37**, 114-118.

**Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robinson, C. S., Whitt, M. A., and Miyamura, T. (2001).** Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263-275.

**Meier, V., Burger, E., Mihm, S., Saile, B., and Ramadori, G. (2003).** Ribavirin inhibits DNA, RNA, and protein synthesis in PHA-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: Possible explanation for therapeutic efficacy in patients with chronic HCV infection. *J.Med.Virol.* **69**, 50-58.

**Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., and**

- Kneteman, N. M. (2001).** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat.Med.* **7**, 927-933.
- Meyer, K., Basu, A., and Ray, R. (2000).** Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* **276**, 214-226.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997).** Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology* **78 ( Pt 9)**, 2299-2306.
- Miller, N. and Hutt-Fletcher, L. M. (1992).** Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *Journal of Virology* **66**, 3409-3414.
- Mizokami, M. and Orito, E. (1999).** Molecular evolution of hepatitis viruses. *Intervirology* **42**, 159-165.
- Mizutani, T., Kato, N., Ikeda, M., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996).** Long-term human T-cell culture system supporting hepatitis C virus replication. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **227**, 822-826.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999).** Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J.Med.Virol.* **57**, 223-229.
- Muller, H. M., Pfaff, E., Goeser, T., Kallinowski, B., Solbach, C., and Theilmann, L. (1993).** Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *Journal of General Virology* **74 ( Pt 4)**, 669-676.
- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., and Nomoto, A. (2001).** Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Archives of Virology* **146**, 729-741.
- Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H., and Shimizu, Y. K. (1996).** Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **70**, 3325-3329.
- Nam, J. H., Bukh, J., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (2001).** High-level expression of hepatitis C virus (HCV) structural proteins by a chimeric HCV/BVDV genome propagated as a BVDV pseudotype. *J.Virol.Methods* **97**, 113-123.

- Netter, H. J., Macnaughton, T. B., Woo, W.-P., Tindle, R., and Gowans, E. J. (2001).** Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *Journal of Virology* **75**, 2130-2141.
- Neufeld, E. B., Cooney, A. M., Pitha, J., Dawidowicz, E. A., Dwyer, N. K., Pentchev, P. G., and Blanchette-Mackie, E. J. (1996).** Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *The journal of biological chemistry* **271**, 21604-21613.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., and Perelson, A. S. (1998).** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-107.
- Nichols, B. J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001).** Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* **11**, 406-412.
- Noguchi, M. and Hirohashi, S. (1996).** Cell lines from non-neoplastic liver and hepatocellular carcinoma tissue from a single patient. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* **32**, 135-137.
- Norkin, L. C. (1999).** Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol.Rev.* **168**, 13-22.
- Ogata, S., Nagano-Fujii, M., Ku, Y., Yoon, S., and Hotta, H. (2002).** Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 3625-3630.
- Okuma, K., Matsuura, Y., Tatsuo, H., Inagaki, Y., Nakamura, M., Yamamoto, N., and Yanagi, Y. (2001).** Analysis of the molecules involved in human T-cell leukaemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoprotein. *Journal of General Virology* **82**, 821-830.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, L., and Dubuisson, J. (2001).** Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of General Virology* **82**, 2589-2595.
- Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000).** The transmembrane domains of hepatitis



C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *The journal of biological chemistry* **275**, 31428-31437.

**Orlandi, P. A. and Fishman, P. H. (1998).** Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J.Cell Biol.* **141**, 905-915.

**Owens, R. J. and Rose, J. K. (1993).** Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **67**, 360-365.

**Park, J. S., Yang, J. M., and Min, M. K. (2000).** Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **267**, 581-587.

**Parton, R. G. and Lindsay, M. (1999).** Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol.Rev.* **168**, 23-31.

**Pasquier, C., Bujan, L., Daudin, M., Righi, L., Berges, L., Thauvin, L., Berrebi, A., Massip, P., Puel, J., and Izopet, J. (2003).** Intermittent detection of hepatitis C virus (HCV) in semen from men with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HCV. *J.Med.Virol.* **69**, 344-349.

**Pawlotsky, J. M. and Germanidis, G. (1999).** The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J.Viral Hepat.* **6**, 343-356.

**Perez, M., Watanabe, M., Whitt, M. A., and De La Torre, J. C. (2001).** N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *Journal of Virology* **75**, 7078-7085.

**Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S., and Grandi, G. (2000).** Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *Journal of Virology* **74**, 4824-4830.

**Piccininni, S., Varaklioti, A., Nardelli, M., Dave, B., Raney, K. D., and McCarthy, J. E. (2002).** Modulation of the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA Polymerase Activity

by the Non-Structural (NS) 3 Helicase and the NS4B Membrane Protein. *The journal of biological chemistry* **277**, 45670-45679.

**Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., and Bartenschlager, R. (2001).** Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *Journal of Virology* **75**, 1252-1264.

**Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998).** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.

**Polyak, S. J., Paschal, D. M., McArdle, S., Gale, M. J., Jr., Moradpour, D., and Gretch, D. R. (1999).** Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* **29**, 1262-1271.

**Prince, A. M., Huima-Byron, T., Parker, T. S., and Levine, D. M. (1996).** Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J.Viral Hepat.* **3**, 11-17.

**Puri, V., Watanabe, R., Singh, R. D., Dominguez, M., Brown, J. C., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2001).** Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J.Cell Biol.* **154**, 535-547.

**Ray, R. B. and Ray, R. (2001).** Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol.Lett.* **202**, 149-156.

**Rijnbrand, R., Bredenbeek, P. J., Haasnoot, P. C., Kieft, J. S., Spaan, W. J., and Lemon, S. M. (2001).** The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA.* **7**, 585-597.

**Robinson, C. S. and Whitt, M. A. (2000).** The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *Journal of Virology* **74**, 2239-2246.

- Rosen, H. R. (2002).** Hepatitis C in the liver transplant recipient: current understanding and treatment. *Microbes.Infect.* **4**, 1253-1258.
- Rosenberg, S. (2001).** Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J.Mol.Biol.* **313**, 451-464.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992).** Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M. A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Inchauspe, G., and Trepo, C. (1999).** Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *Journal of General Virology* **80** ( Pt 11), 3007-3018.
- Salisbury, J. L., Condeelis, J. S., and Satir, P. (1980).** Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor- mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *J.Cell Biol.* **87**, 132-141.
- Samuel, C. E. (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**, 778-809, table.
- Sasaki, M., Yamauchi, K., Nakanishi, T., Kamogawa, Y., and Hayashi, N. (2003).** In vitro binding of hepatitis C virus to CD81-positive and -negative human cell lines. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **18**, 74-79.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., and Kohn, L. D. (2003).** Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of Virology* **77**, 546-559.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21** , 5017-5025.

- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C. M., Blum, H. E., and Moradpour, D. (2001).** Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA- dependent RNA polymerase. *The journal of biological chemistry* **276**, 44052-44063.
- Schnell, M. J., Buonocore, L., Whitt, M. A., and Rose, J. K. (1996).** The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **70**, 2318-2323.
- Schnitzer, T. J., Dickson, C., and Weiss, R. A. (1979).** Morphological and biochemical characterization of viral particles produced by the tsO45 mutant of vesicular stomatitis virus at restrictive temperature. *Journal of Virology* **29**, 185-195.
- Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L., and Goeser, T. (1997).** Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *Journal of General Virology* **78 ( Pt 10)**, 2467-2476.
- Seong, Y. R., Lee, C. H., and Im, D. S. (1998).** Characterization of the structural proteins of hepatitis C virus expressed by an adenovirus recombinant. *Virus Res.* **55**, 177-185.
- Shata, M. T., Anthony, D. D., Carlson, N. L., Andrus, L., Brotman, B., Tricoche, N., McCormack, P., and Prince, A. (2002).** Characterization of the immune response against hepatitis C infection in recovered, and chronically infected chimpanzees. *J.Viral Hepat.* **9**, 400-410.
- Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1996).** Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* **23**, 205-209.
- Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D. C., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1998).** Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *Journal of General Virology* **79 ( Pt 6)**, 1383-1386.
- Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1992).** Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 5477-5481.

- Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999).** Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of Virology* **73**, 9718-9725.
- Shin, J. S. and Abraham, S. N. (2001).** Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes.Infect.* **3**, 755-761.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002).** Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *The journal of biological chemistry* **277**, 11149-11155.
- Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X., and Tall, A. R. (2001).** High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *The journal of biological chemistry* **276**, 25287-25293.
- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and Frank, J. (2001).** Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* **291**, 1959-1962.
- Steinkuhler, C., Urbani, A., Tomei, L., Biasiol, G., Sardana, M., Bianchi, E., Pessi, A., and De Francesco, R. (1996).** Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *Journal of Virology* **70**, 6694-6700.
- Stockert, R. J. (1995).** The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* **75**, 591-609.
- Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F. M., Tinari, A., Donelli, G., and Orsi, N. (1987).** Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *Journal of General Virology* **68 ( Pt 2)**, 387-399.
- Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., and Matsuura, Y. (1999).** Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology* **42**, 145-152.

**Takada, A., Robinson, C. S., Goto, H., Sanchez, A., Murty, K. G., Whitt, M. A., and Kawaoka, Y. (1997).** A system for functional analysis of ebola virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94**, 14764-14769.

**Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000).** Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 5066-5074.

**Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1995).** Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *Journal of Virology* **69**, 3980-3986.

**Tatsuo, H., Okuma, K., Tanaka, K., Ono, N., Minagawa, H., Takade, A., Matsuura, Y., and Yanagi, Y. (2000).** Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 4139-4145.

**Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002).** Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol.Biol.Cell* **13**, 238-250.

**Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A. R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L. D., and Liang, T. J. (2002).** Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *Journal of Virology* **76**, 9335-9344.

**Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., and Mavromara, P. (2002).** Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *The journal of biological chemistry* **277**, 17713-17721.

**Vargas, H. E., Laskus, T., Radkowski, M., Wilkinson, J., Balan, V., Douglas, D. D., Harrison, M. E., Mulligan, D. C., Olden, K., Adair, D., and Rakela, J. (2002).** Detection of hepatitis C virus sequences in brain tissue obtained in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl.* **8**, 1014-1019.

**Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C.-T., Nuti, S., Klimpel, G. R., and Abrignani, S. (2001).** Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *European Journal of Immunology* **31**, 166-175.

**Wang, Q. M. and Heinz, B. A. (2000).** Recent advances in prevention and treatment of hepatitis C virus infections. *Prog. Drug Res.* **55**, 1-32.

**Weigel, P. H. and Yik, J. H. (2002).** Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 341-363.

**Weiner, A. J., Christopherson, C., Hall, J. E., Bonino, F., Saracco, G., Brunetto, M. R., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., Venkatakrishna, S., and . (1991).** Sequence variation in hepatitis C viral isolates. *Journal of Hepatology* **13 Suppl 4**, S6-14.

**Wellnitz, S., Klumpp, B., Barth, H., Ito, S., Depla, E., Dubuisson, J., Blum, H. E., and Baumert, T. F. (2002).** Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *Journal of Virology* **76**, 1181-1193.

**Whitt, M. A., Chong, L., and Rose, J. K. (1989).** Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *Journal of Virology* **63**, 3569-3578.

**Whitt, M. A., Zagouras, P., Crise, B., and Rose, J. K. (1990).** A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal of Virology* **67**, 4907-4913.

**Wood, J., Frederickson, R. M., Fields, S., and Patel, A. H. (2001).** Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. *Journal of Virology* **75**, 1348-1358.

**Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N., and Stapleton, J. T. (2000).** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Virology* **74**, 10055-10062.

**Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J., and Ou, J. (2001).** Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* **20**, 3840-3848.

**Yamaga, A. K. and Ou, J. H. (2002).** Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *The journal of biological chemistry* **277**, 33228-33234.

**Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., and Kohara, M. (1998).** The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* **72**, 6048-6055.

**Yoo, B. J., Selby, M. J., Choe, J., Suh, B. S., Choi, S. H., Joh, J. S., Nuovo, G. J., Lee, H. S., Houghton, M., and Han, J. H. (1995).** Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with in vitro-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. *Journal of Virology* **69**, 32-38.

**Zavada, J. (1982).** The pseudotypic paradox. *Journal of General Virology* **63 (Pt 1)**, 15-24.