



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Option Biologie Moléculaire et cellulaire

par Marie WOLF

**La protéine ARFP du Virus de l'Hépatite C :
Mécanismes de traduction, régulation de synthèse et
construction d'outils pour l'étude du rôle de la protéine
dans l'infection virale.**

Présentée et soutenue publiquement le 15 Décembre 2006

Membres du jury:

Directeur de Thèse	Dr Catherine SCHUSTER, CR INSERM, HDR, Strasbourg.
Rapporteur externe	Dr Annie CAHOUR, DR CNRS, Paris.
Rapporteur externe	Dr Glauca PARANHOS-BACCALA, Chef de projet BIOMERIEUX, Lyon
Rapporteur interne	Prof David GILMER, Strasbourg.
Examineur	Prof Françoise STOLL-KELLER, Strasbourg
Examineur	Prof Thomas BAUMERT, Strasbourg

Sept fois à terre, huit fois debout.

Proverbe chinois

Je tiens à remercier le Dr Anne-Marie Aubertin qui m'a accueillie au sein de l'U544 lors de mon arrivée au laboratoire. Vous avez toujours été disponible pour moi et je vous en suis reconnaissante.

Un grand merci au Professeur Françoise Stoll-Keller pour avoir dirigé l'EA3770 pendant les « années noires » du laboratoire avec l'élégance qui la caractérise.

Merci également au Professeur Thomas Baumert qui a permis la création de l'unité U748 en janvier 2006 et remis l'équipe VHC sur pied.

Merci à vous deux d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, le Dr Annie Cahour, le Dr Glauca Parhanos-Baccala et le Professeur David Gilmer de me faire l'honneur de juger ce travail de thèse.

Merci à la fondation BNP-Paribas qui a financé ce travail, et à l'Association pour la Recherche sur le Cancer qui a rétribué ma dernière année de thèse.

Catherine, après tout ce qu'on a vécu ensemble j'ai un peu de mal à trouver les mots. En tant que directrice de thèse, tu m'as guidée tout en me laissant l'indépendance dont j'avais besoin, et j'ai pu apprécier ta grande ouverture d'esprit et ton talent à proposer des solutions même quand tout semble impossible. Tu m'as appris tout ce que je sais à la paillasse, et bien plus encore à côté et je t'en remercie infiniment. Je risque de te solliciter encore à l'avenir... En tant qu'amie, tu m'as montré qu'on peut rire de tout et surtout en toute circonstance, même quand ça peut pas être pire (ah ben si ça peut...). Je crois que rien ne me manquera plus que nos bavardages et « refaisages » de monde du soir à la cafet. Je peux partir sereine en sachant que maintenant ça va aller bien pour toi. Chef, merci mille fois pour tout.

Maria, avant tout je tiens à te présenter publiquement mes excuses pour avoir volé ton portoir le 12 septembre 2001, 3^e jour de mon DEA (en même temps t'avais qu'à marquer ton nom...). Ca aurait difficilement pu à la fois plus mal commencer et mieux finir entre nous. Merci pour ta générosité et tous les moments mémorables au labo qui ont fait que je m'y sentais si bien, j'aurais tellement voulu que tu reviennes plus tôt... Heureusement pour toi s'en vont avec moi les blagues lourdes sur les femmes de médecin turques et leurs appareils à raclette ultra rapides, tu vas enfin avoir la paix ! (t'as vu, j'ai réussi à ne parler ni de ton rire ni de ton grain de beauté...)

Je n'allais pas continuer par quelqu'un d'autre qu'Isa, ma topine et dernier membre des réplique girls. Merci pour l'insouciance et la légèreté de mes premières années au labo, nos

papotages à n'en plus finir, et pour tes visites à Strasbourg qui m'ont souvent remonté le moral. T'as vu, j'ai survécu ! Réserve-moi un weekend, cette fois c'est moi qui arrive.

Merci Marie pour les moments de complicité et pour ton aide précieuse dans mon travail, je te suis redevable d'un nombre incalculable d'heures de séquençage. Un grand merci aux autres membres de l'équipe VHC, à Christine pour ta serviabilité, à Cathy pour ton efficacité et ta disponibilité, à Eric pour les commérages de bout de paillasse, à Jean-Pierre pour la finesse de tes blagues, à Sophie bon courage pour la suite, Evelyne, Michèle, Samira, Min Li et enfin à la part masculine de l'équipe qui est partie, François et Jean-Da, pour avoir enduré de cette « ambiance de gonzesses » plus ou moins avec le sourire.

Merci à Maryvonne pour toutes les commandes passées, et à Anne et Joëlle qui reprennent le flambeau pour leur gentillesse, à Evelyne pour tous les coups de fils transférés. Merci à Rosalba pour ton extrême gentillesse et ton aide si précieuse au quotidien, on n'y arriverait pas sans toi. Merci à Sigis pour la subtilité de ton humour et la résolution de tous les problèmes possibles et imaginables. Merci à Alvaro pour toutes les réparations dans la bonne humeur.

Merci enfin à toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de ces années, Sylvie et Gégé et leurs conseils resto/recettes, Maryse, Thomas, Xu Ke, Vincent, Christiane, Nicolas, Dominique, Liliane, et à toutes les autres qui sont passés par l'institut. Un merci aux filles du diag pour la bonne ambiance à la cafet, en particulier à Muriel.

Merci à mes cops du midi, pour les heures de rigolade, les litres de café et les kilos de m&m's au relaisH et le sas de décompression que ça permet. Sandra, je te souhaite le meilleur pour la suite, tu vas y arriver j'en suis sûr.

Merci à Mélanie qui est venue exprès de Grèce, si c'est pas une copine ça (au fait je suis dispo pour être demoiselle d'honneur à Santorin, si, si j'insiste...)

Un immense merci à ma famille. Merci à mes parents qui n'ont jamais remis en question mes choix et qui ont rendu tout ça possible par leur soutien et leur confiance. Merci, merci, merci. Merci Mamie pour les tablettes de chocolat fourrées du dimanche et pour avoir toujours bien pris soin de moi. Merci à Greg (qui s'occupe des cadeaux de Noël cette année) et Nicola. Merci à Edouard pour le mythique vélo rose et les dimanches midis animés, à Haja, Aline et Irina.

Mon dernier merci est pour toi. Tovo, tu as dû subir les montagnes russes de ces dernières années, tu m'as soutenue en toute circonstance, tu as pansé mes blessures, supporté mon humeur chaotique et bien souvent fait relativiser. Merci de ne pas t'être sauvé et au contraire d'avoir été présent à tous les instants, et de continuer l'aventure à mes côtés.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	10
INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX	12
A. INTRODUCTION GENERALE.....	15
I. L'Hépatite C.....	16
I.1 Découverte du virus.....	16
I.2 Epidémiologie.....	17
I.3 Physiopathologie.....	17
I.3.1 Histoire naturelle de l'infection.....	17
I.3.1.1 La phase aiguë.....	18
I.3.1.2 La résolution de l'infection.....	18
I.3.1.3 L'infection chronique.....	18
I.3.1.4 Défenses de l'hôte : la voie interféron.....	19
I.3.1.5 Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire.....	20
I.3.2 Le foie, organe cible de l'infection.....	22
I.3.2.1 La cirrhose.....	22
I.3.2.2 L'hépatocarcinome.....	22
I.3.3 Pathologies extra hépatiques.....	23
I.3.3.1 La cryoglobulinémie mixte.....	23
I.3.3.2 Désordres lymphoprolifératifs.....	24
I.4 Modes de transmission.....	24
I.4.1 La transfusion sanguine.....	24
I.4.2 La toxicomanie.....	25
I.4.3 Risque lié aux gestes thérapeutiques.....	26
I.4.4 Tatouage, piercing et autres modes de contamination.....	27
I.4.5 La contamination sexuelle.....	27
I.4.6 La transmission verticale.....	28
I.4.7 La transmission intrafamiliale.....	28
I.4.8 Prévenir la transmission du VHC.....	29
I.5 Facteurs de risque.....	29
I.5.1 Le facteur alcool.....	29
I.5.2 Le syndrome métabolique.....	30
I.6 Dépistage du VHC.....	30
I.7 Traitements et nouvelles thérapeutiques.....	31
I.8 Essais vaccinaux.....	32
II. Le virus de l'Hépatite C.....	34
II.1 Taxonomie.....	34
II.2 Organisation génomique.....	34
II.2.1 La région 5' non traduite.....	35
II.2.2 La phase ouverte de lecture.....	35
II.2.3 La région 3' non traduite.....	35

II.3 Structure et fonction des protéines virales.....	36
II.3.1 Les protéines structurales.....	37
II.3.1.1 La protéine core.....	37
II.3.1.2 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	39
II.3.1.3 La protéine p7.....	41
II.3.2 Les protéines non structurales.....	42
II.3.2.1 La protéine NS2.....	42
II.3.2.2 La protéine NS3.....	43
II.3.2.3 La protéine NS4A.....	44
II.3.2.4 La protéine NS4B.....	44
II.3.2.5 La protéine NS5A.....	45
II.3.2.6 La protéine NS5B.....	46
II.4 Modèles d'étude.....	47
II.4.1 Les modèles animaux.....	47
II.4.1.1 Le chimpanzé.....	47
II.4.1.2 Les autres modèles.....	48
II.4.2 Les glycoprotéines solubles.....	48
II.4.3 Les particules virus-like (VHC-LPs).....	48
II.4.4 Les pseudotypes VHC/VSV.....	49
II.4.5 Les pseudoparticules VHCpp.....	50
II.4.6 Les réplicons subgénomiques.....	50
II.4.7 Le système de propagation du VHC en culture cellulaire.....	51
II.4.7.1 Le clone JFH1.....	51
II.4.7.2 Méthodes de culture.....	51
II.5 Cycle viral.....	52
II.5.1 Attachement et entrée de la particule virale.....	53
II.5.1.1 La tétraspanine CD81.....	53
II.5.1.2 Le récepteur humain de type scavenger de classe B et de type I : SR-BI.....	53
II.5.1.3 Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité rLDL.....	54
II.5.1.4 Les glycosaminoglycanes.....	55
II.5.1.5 Les lectines de type C.....	55
II.5.1.6 Claudin-1.....	56
II.5.2 Internalisation de la particule virale.....	57
II.5.3 Traduction des protéines virales.....	58
II.5.3.1 Traduction de la polyprotéine.....	58
II.5.3.2 Modulation de la traduction par des facteurs viraux.....	59
II.5.3.3 Modulation de la traduction par des facteurs cellulaires.....	60
II.5.3.4 Clivages co- et post-traductionnels.....	61
II.5.4 Réplication de l'ARN viral.....	62
II.5.4.1 Du brin (+) au brin (-), du brin (-) au brin (+).....	62
II.5.4.2 Membranes cellulaires, métabolisme lipidique et réplication.....	63
II.5.4.3 Modulation de la réplication par les protéines virales.....	64
II.5.4.4 Modulation de la réplication par des facteurs cellulaires.....	65
II.5.5 Assemblage et relargage des virions.....	66
II.5.5.1 Encapsidation.....	66
II.5.5.2 Sortie des virions.....	66
B. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	68
C. MATERIEL ET METHODES.....	71
I. Matériel.....	72
I.1 Vecteurs plasmidiques.....	72

I.1.1 p90/HCV FL long pU.....	72
I.1.2 pCI-neo.....	72
I.1.3 pEGFP-N1 et pEGFP-C1.....	72
I.1.4 pBI-L Tet.....	73
I.1.5 pGBKT7.....	73
I.1.6 pGADT7.....	73
I.1.7 pACT2.....	74
I.1.8 pGEX-4T-1.....	74
I.1.9 pTG13387.....	74
I.1.10 pTG6624.....	75
I.2 Souches bactériennes.....	75
I.2.1 XL-1 Blue.....	75
I.2.2 BL21.....	75
I.2.3 BJ5183.....	75
I.3 Levures.....	76
I.4 Virus.....	76
I.4.1 Adénovirus recombinants.....	76
I.4.2 Virus recombinant de la vaccine.....	76
I.5 Lignées cellulaires.....	76
I.5.1 Lignée Huh-7.....	76
I.5.2 Lignée HEK 293.....	77
I.5.3 HeLa.....	77
II. Méthodes de Virologie.....	78
II.1 Génération d'adénovirus recombinants non réplicatifs.....	78
II.1.1 Clonage dans le vecteur de transfert.....	78
II.1.2 Recombinaison homologue.....	79
II.1.3 Production de virus recombinant.....	79
II.2 Titrage des adénovirus recombinants.....	79
II.3 Protocole d'infection par les adénovirus recombinants.....	80
II.4 Protocole d'infection par le virus recombinant de la Vaccine souche MVA.....	80
III. Méthodes de Biologie Moléculaire et cellulaire.....	81
III.1 Méthodes concernant les acides nucléiques.....	81
III.1.1 Amplification et préparation de fragments d'ADN.....	81
III.1.2 Préparation de bactéries compétentes.....	81
III.1.3 Transformation de bactéries compétentes.....	82
III.1.4 Préparations d'ADN plasmidique.....	82
III.1.5 Constructions plasmidiques réalisées.....	83
III.1.5.1 Constructions en fusion à la GFP.....	83
III.1.5.2 Construction en fusion à la luciférase.....	83
III.1.5.3 Constructions en fusion au tag HA.....	83
III.1.5.4 Constructions en fusion à la GST.....	83
III.2 Transfection de cellules eucaryotes.....	84
III.2.1 Phosphate de calcium.....	84
III.2.2 Lipofectamine.....	84
III.3 Test luciférase.....	85
III.3.1 A partir de lysats cellulaires.....	85
III.3.2 A partir de milieu réactionnel in vitro.....	85
III.3.2.1 Transcription in vitro.....	85

III.3.2.2 Traduction in vitro.....	86
III.3.2.3 Dosage de la luciférase	86
III.4 Western blot	86
III.4.1 Préparation de lysats cellulaires.....	86
III.4.2 Gels Tris-glycine en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	86
III.4.3 Gels Tris-tricine.....	87
III.4.4 Transfert sur membrane PVDF	87
III.4.5 Immunodétection des protéines transférées.....	87
III.5 Double hybride dans la levure.....	88
III.5.1 Choix de la banque à cribler	88
III.5.2 Construction de l'hameçon.....	88
III.5.3 Mating	88
III.5.4 Criblage de la banque	89
III.5.5 Transformation de levures à l'acétate de lithium.....	89
III.6 Caractérisation d'interactions protéine-protéine in vitro	90
III.6.1 Transcription et traduction in vitro en présence de [³⁵ S]Méthionine.....	90
III.6.2 Surproduction de la protéine $\Delta_{86/88}$ ARFP en bactérie	90
III.6.3 Précipitation par GST pull-down	91
D. ETUDE DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION DE LA PROTEINE ARFP DU VHC.....	92
I. Mécanismes de traduction dans la cellule eucaryote	93
I.1 La traduction coiffe-dépendante	94
I.1.1 Le modèle closed-loop.....	95
I.1.2 L'initiation coiffe-dépendante	95
I.1.3 Le modèle scanning.....	96
I.1.4 L'élongation et la terminaison	97
I.2 Le leaky scanning	97
I.3 La réinitiation.....	98
I.4 L'initiation interne	99
I.5 Le détournement (« shunt ») du ribosome	100
I.6 Le recodage de codon («functional recoding ou readthrough»)	101
I.7 Le décalage de cadre de lecture (« frameshift »)	102
I.7.1 Glissement de cadre de lecture -1	102
I.7.2 Glissement de cadre de lecture +1.....	104
II. Mécanismes alternatifs de traduction du VHC : la protéine ARFP	106
III. Résultats soumis à publication	109
IV. Résultats complémentaires.....	127
IV.1 Influence de la lignée cellulaire sur la traduction d'ARFP	127
IV.1.1 HEK293 et HeLa.....	127
IV.1.2 Hépatocytes primaires	128
IV.2 Estimation de la stabilité de ARFP	128
IV.3 Etude de la traduction d'ARFP in vitro	129
IV.4 Influence des protéines virales sur la traduction	130
IV.4.1 Influence des protéines structurales	130
IV.4.2 Influence des protéines non structurales	131

V. Conclusion	132
E. FONCTION DE LA PROTEINE ARFP DANS LA CELLULE HOTE	133
I. Etude de la localisation d'ARFP dans la cellule	136
II. Recherche d'interactants d'ARFP par double-hybride dans la levure	138
II.1 Principe du criblage d'une banque d'ADNc par double-hybride	138
II.2 Recherche d'interactants de fARFP	139
II.2.1 Expression de fARFP dans la levure.....	139
II.2.2 Criblage de la banque d'ADNc.....	140
II.2.2.1 Banque d'ADNc	140
II.2.2.2 Principe du mating.....	140
II.2.2.3 Souches de levures utilisées	140
II.2.2.4 Criblage de la banque d'ADNc par fARFP.....	141
II.2.2.5 Spécificité de l'interaction dans la levure.....	141
II.2.2.6 Identification des interactants.....	142
II.3 Validation des interactants avec ii _{86/88} ARFP	142
II.4 Caractérisation des interactions	143
II.4.1 In vitro	143
II.4.2 Co-localisation dans la cellule	143
II.5 Test de l'interaction entre fARFP et les autres protéines du VHC.....	144
II.5.1 Test de l'homodimérisation de fARFP.....	144
II.5.2 Test de l'interaction de fARFP avec la protéine core.....	144
II.5.3 Test de l'interaction de fARFP avec les protéines non structurales	144
III. Outils construits pour l'étude de la fonction d'ARFP	145
III.1 Production d'anticorps anti-fARFP.....	145
III.2 Lignée stable exprimant fARFP de façon constitutive.....	146
III.3 Lignée stable exprimant fARFP de façon inducible	146
III.4 Construction d'adénovirus recombinants.....	148
III.5 Construction d'un clone JFH-1 muté dans les sites d'initiation d'ARFP	149
IV. Conclusion	151
F. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	153
G. ANNEXES	160
I. Réplication du virus de l'hépatite C : Systèmes d'étude, avantages et limites	161
II. Tableau récapitulatif des constructions plasmidiques réalisées	170
H. BIBLIOGRAPHIE	175

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

aa	acide aminé
AD	Site d'activation
AG	Acides gras
ALAT	Alanine aminotransférase
ARFP	Alternate reading frame protein
VHCcc	Système de propagation du VHC en culture cellulaire
CRE	<i>Cis</i> -acting regulatory element
DBD	Site de liaison à l'ADN
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
eIF	Eukaryotic initiation factor
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
GBV-B	GB virus B
HDL	High density lipoprotein
HS	Héparanes sulfates
HSPG	Protéoglycanes de surface
HVR	Région hyper variable
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon stimulated gene
JFH-1	Japanese Fulminant Hepatitis 1
LD	Lipide droplets
LDL	Low density lipoprotein
LEL	Large extracellular loop
VHC-LP	VHC Like particles
NS	Protéine non structurale
nt	Nucléotide
NTR	Région non traduite
ORF	Cadre ouvert de lecture
PAMP	pathogen-associated molecular pattern

PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PKR	Protéine kinase R
VHCpp	Pseudoparticules de VHC
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-1	Retinoic acid inducible gene 1
rLDL	Récepteur aux low density lipoproteins
RT-PCR	Réaction reverse de polymérisation en chaîne
SEL	Small extracellular loop
SP	Signal peptidase
SPP	Signal-peptide peptidase
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TLR-3	Toll-like receptor 3
TRIF	Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptator inducing IFN β
UAS	GAL-4 responsive upstream activating sequence
uORF	Cadre ouvert de lecture en aval
VAP	Protéine associée aux vésicules
VLDL	Very low density lipoprotein
VHB	Virus de l'hépatite B
VHA	Virus de l'hépatite A
VHC	Virus de l'hépatite C
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Les numéros sont ceux des pages en face desquelles sont insérés les figures et les tableaux.

FIGURES

Figure 1	Prévalence estimée de l'infection VHC dans le monde.....	17
Figure 2	Histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	17
Figure 3	Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire lors de l'infection VHC aiguë.....	18
Figure 4	Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC.....	19
Figure 5	Les interactions VHC-hôte régulent la réponse de l'hôte et le devenir de l'infection.....	21
Figure 6	Modes de transmission du VHC.....	24
Figure 7	Organisation génomique du VHC et fonctions des protéines virales.....	34
Figure 8	Structure de la région 5' non traduite du VHC.....	35
Figure 9	Modèle de structure secondaire de la région 3' non traduite du VHC.....	35
Figure 10	Topologie des protéines du VHC dans la membrane du réticulum endoplasmique.....	36
Figure 11	Modèle de la conformation de la protéine core et de sa localisation aux gouttelettes lipidiques.....	37
Figure 12	Image d'une gouttelette lipidique en microscopie électronique.....	38
Figure 13	Conformation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 à la membrane du réticulum endoplasmique.....	39
Figure 14	Conformation de p7 dans la membrane du réticulum endoplasmique.....	41
Figure 15	Structure du domaine NS2 après clivage par la protéase NS2/3.....	42
Figure 16	Structure du complexe hélicase-protéase NS3/4A.....	43
Figure 17	Modèle topologique de NS4B.....	44
Figure 18	Modèle de la conformation de NS5A à la membrane du réticulum endoplasmique.....	45
Figure 19	Modèle du complexe NS5B-matrice-rNTP.....	47

Figure 20	Stratégie d'obtention des VHC-LPs.....	49
Figure 21	Construction des pseudoparticules VHCpp.....	50
Figure 22	Stratégie expérimentale utilisée pour développer les réplicons subgénomiques....	50
Figure 23	Génération de virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectivité in vivo.....	51
Figure 24	Cycle viral du VHC.....	52
Figure 25	Structure de CD81.....	53
Figure 26	Modèle topologique de SR-BI.....	54
Figure 27	Représentation schématique du récepteur aux LDL.....	54
Figure 28	Structure des héparanes sulfates.....	55
Figure 29	Représentation schématique des récepteurs DC-SIGN et L-SIGN.....	56
Figure 30	Structure des récepteurs de la famille des Claudin.....	56
Figure 31	Voies d'endocytose utilisées par les virus.....	57
Figure 32	Modèle de l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction dirigé par l'IRES du VHC.....	58
Figure 33	Maturation de la polyprotéine du VHC et localisation des protéines virales au réticulum endoplasmique.....	61
Figure 34	Représentation schématique des brins (+) et (-) du VHC.....	63
Figure 35	Modèle d'interaction entre les protéines non structurales du VHC et les VAP.....	64
Figure 36	Cadres ouverts de lecture présents dans la séquence du VHC.....	69
Figure 37	Cartes des vecteurs utilisés.....	72
Figure 38	Représentation schématique de la traduction d'un ARNm eucaryote et sites principaux de l'action des virus.....	93
Figure 39	Modèle closed-loop de la traduction d'un ARNm.....	95
Figure 40	Modèle de terminaison de la traduction chez les eucaryotes.....	97
Figure 41	Mécanisme de décalage de cadre de lecture -1.....	103
Figure 42	Mesure de la traduction en phase 0 et +1 de la séquence core dans des hépatocytes primaires.....	128
Figure 43	Evaluation de la stabilité d'ARFP en présence de l'inhibiteur de protéasome MG132	129
Figure 44	Etude de la traduction d'ARFP <i>in vitro</i> en lysats de réticulocytes de lapin.....	130
Figure 45	Influence des protéines structurales sur la traduction d'ARFP.....	131
Figure 46	Influence des protéines non structurales sur la traduction d'ARFP.....	131

Figure 47	Localisation des protéines fARFP-EGFP, core-EGFP, et EGFP seule par microscopie confocale dans les cellules Huh-7.....	136
Figure 48	Principe du double hybride.....	139
Figure 49	Détection des protéines de fusion DBD-fARFP et DBD-ii _{86/88} ARFP.....	139
Figure 50	Principe du mating.....	140
Figure 51	Gènes rapporteurs des souches de levure AH109 et Y187.....	140
Figure 52	Criblage d'une banque d'ADNc de foie humain pour la recherche d'interactants de la protéine fARFP en double-hybride dans la levure.....	141
Figure 53	Récapitulatif des candidats interactants de fARFP identifiés par double-hybride dans la levure.....	142
Figure 54	Détection de l'interaction entre ii _{86/88} RFP et les candidats sélectionnés.....	142
Figure 55	Test des anticorps produits contre la protéine fARFP.....	145
Figure 56	Caractérisation de lignées stables exprimant fARFP de façon constitutive.....	146
Figure 57	Dosage de la luciférase en réponse à l'addition de tétracycline dans les lignées stables inductibles.....	147
Figure 58	Caractérisation des adénovirus codant core (Ad1080) et fARFP (Ad1081).....	148

TABLEAUX

Tableau 1	Aperçu des thérapeutiques anti VHC au cours de développement clinique.....	32
Tableau 2	Candidats vaccins prophylactiques et thérapeutiques.....	33
Tableau 3	Longueur de la séquence codante chevauchante dans les différents géotypes du VHC.....	70
Tableau 4	Récapitulatif des adénovirus recombinants construits et des plasmides intermédiaires utilisés.....	78
Tableau 5	Récapitulatif des oligonucléotides utilisés.....	81

A. INTRODUCTION GENERALE

I. L'Hépatite C

I.1 Découverte du virus

Les termes hépatite A et hépatite B ont été introduits en 1947 pour distinguer les hépatites infectieuses (épidémiques) des hépatites sériques (jaunisses) (MacCallum 1947). Cette classification a été adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour remplacer les multiples descriptions appliquées jusqu'alors à ces maladies (World Health Organization 1973). Le virus de l'hépatite B (VHB) a été le premier virus responsable d'une hépatite à être découvert. L'antigène de surface du VHB, HBsAg, a été identifié en 1965 (Blumberg *et al.* 1965), mais ce n'est qu'en 1970 que des particules virales ont été observées (Dane *et al.* 1970). Le VHB est transmis par voie parentérale et sexuelle, et conduit dans certains cas à l'installation d'une infection chronique. En 1973, un deuxième virus de l'hépatite, le virus de l'hépatite A (VHA), a été visualisé par microscopie électronique (Feinstone *et al.* 1973). Le VHA se transmet par voie oro-fécale, mais peut aussi se propager par inoculation de sang infecté, et est responsable de l'apparition d'une maladie très infectieuse après une période d'incubation courte (4 semaines).

A partir des années 1970, des mesures de prévention comme le diagnostic pré-transfusionnel ont été prises pour prévenir la propagation de ces virus. Cependant, ces mesures n'ont pas conduit à une éradication des hépatites virales post-transfusionnelles (Prince *et al.* 1974; Alter *et al.* 1975). Ces cas ont alors été attribués à un nouveau type d'hépatite appelé non-A, non-B. En 1989, une banque d'ADN complémentaire (ADNc) a été construite à partir du plasma d'un chimpanzé ayant développé une hépatite chronique, après infection par le sérum d'un patient infecté par une hépatite non-A, non-B. Le criblage de cette banque d'ADNc et des expériences complémentaires ont ensuite permis d'identifier le virus de l'hépatite C (VHC) comme un ARN de polarité positive (Choo *et al.* 1989). Le VHC est le premier virus entièrement isolé par des méthodes de biologie moléculaire, sans que les particules virales ne soient isolées et que le virus ne puisse être cultivé.

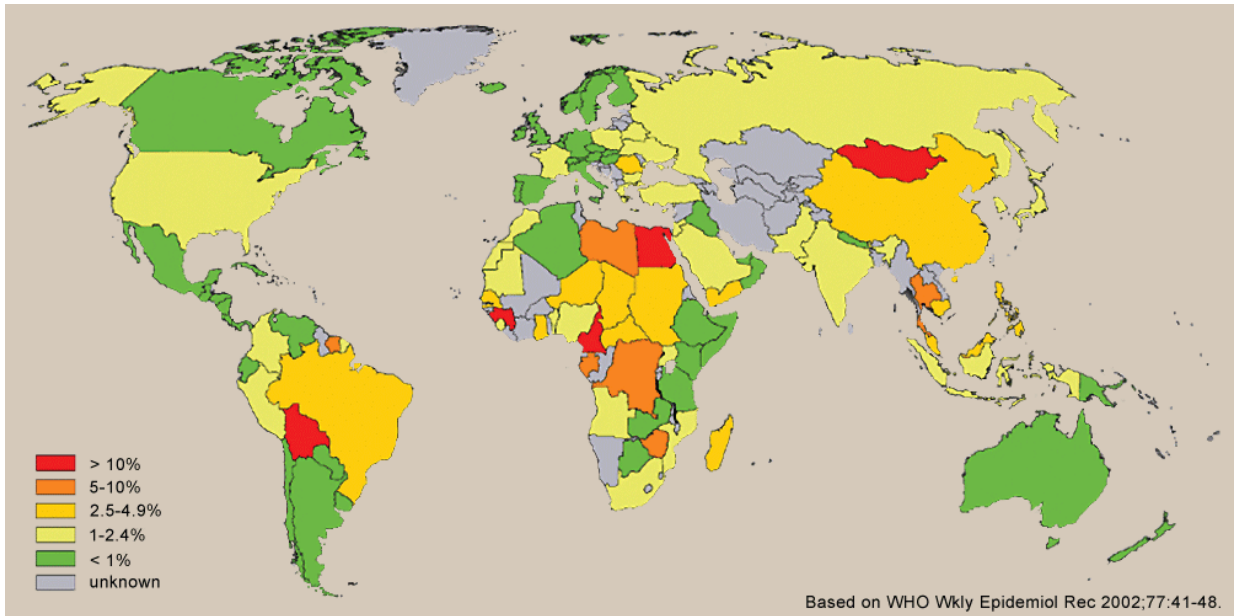


Figure 1. Prévalence estimée de l'infection VHC dans le monde (d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé 2002.)

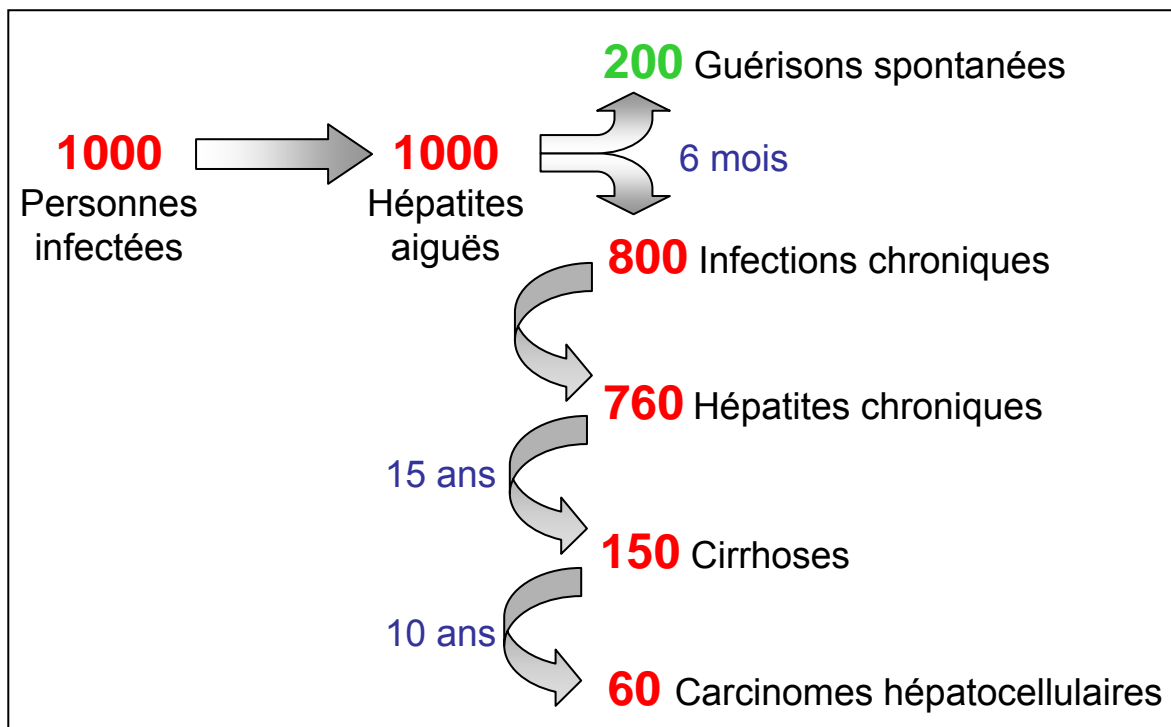


Figure 2. Histoire naturelle de l'infection par le VHC

1.2 Epidémiologie

L'infection par le VHC n'épargne aucune région du monde (**Fig. 1**). Les dernières données de l'OMS font état d'une prévalence moyenne de 3%. Cette prévalence atteint parfois plus de 10% comme en Bolivie, Mongolie, et dans certains pays d'Afrique (World Health Organization 2002). Au niveau mondial, ces 3% correspondent à plus de 170 millions de porteurs chroniques du VHC, dont 4 millions aux Etats Unis et 5 millions en Europe de l'Ouest. En Europe, la proportion de sujets atteints varie de 0,5% à 2% en fonction des pays, avec un gradient croissant Nord-Sud. En Europe de l'Est certains pays sont particulièrement touchés avec jusqu'à 4% de prévalence. En France, on estime que 550.000 à 600.000 personnes sont porteuses de ce virus, soit 1 à 1,2% de la population. La plupart des sujets contaminés ne développent aucun symptôme durant les premières phases de l'infection et il est estimé que plus de la moitié des malades ne connaissent pas leur état sérologique. Des campagnes de dépistage à grande échelle sont donc nécessaires pour proposer des traitements aux individus infectés asymptomatiques et pour éviter la propagation du VHC.

1.3 Physiopathologie

1.3.1 Histoire naturelle de l'infection

Les étapes successives de l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) sont bien connues (**Fig. 2**). Après la contamination par le VHC, qui entraîne dans 100% des cas une hépatite aiguë, la grande majorité (80%) des sujets infectés restent porteurs chroniques du virus. La persistance de l'infection virale conduit à l'apparition de lésions hépatiques et au développement d'une fibrose, qui sont responsables dans 20% des cas de la survenue d'une cirrhose plusieurs années après la contamination. La complication clinique principale est le cancer du foie (hépatocarcinome) qui survient presque exclusivement au stade de cirrhose et est responsable de la mortalité de l'affection. L'incidence de l'apparition d'un hépatocarcinome est d'environ 5%. Ainsi, sur 1000 personnes contaminées par le VHC, 60 développeront un cancer du foie dans un délai moyen de 20 ans

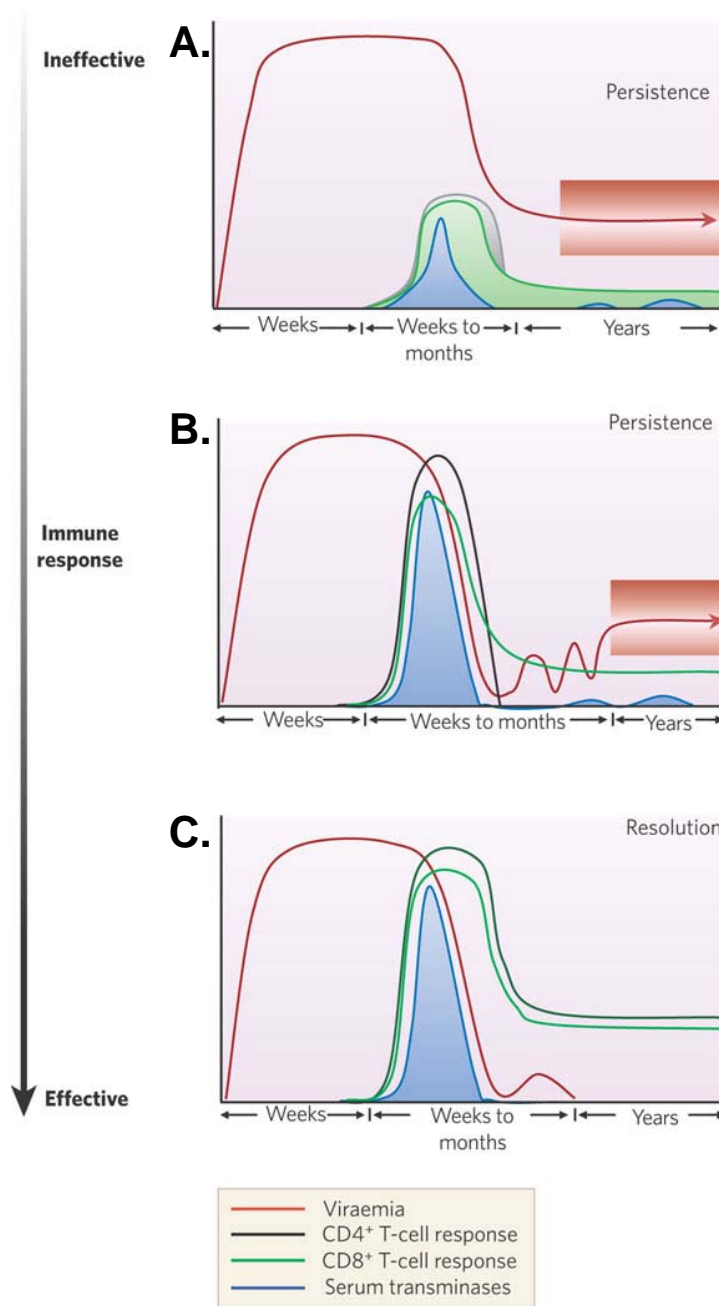


Figure 3. Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire lors de l'infection VHC aiguë (d'après Bowen et Walker 2005.) (A) Cas de la persistance liée à une réponse cellulaire inefficace. (B) Persistance en dépit d'une réponse cellulaire. (C) Mécanismes liés à la clairance virale.

1.3.1.1 La phase aiguë

Tous les individus infectés par le VHC vont développer une hépatite C aiguë, qui est asymptomatique dans 70 à 80% des cas. L'infection aiguë est définie par une virémie détectable (présence de l'ARN viral dans le sérum du patient) et une sérologie anti-VHC négative. L'intensité et la qualité de la réponse immunitaire du sujet vont prédire l'issue de l'infection VHC dans un délai de 6 mois (**Fig. 3**). La séroconversion intervient dans une période variable, de trois mois en moyenne mais qui peut dépasser les six mois. Comme le traitement de l'hépatite C aiguë permet la guérison dans 95% des cas (Jaeckel *et al.* 2001), la détection des cas de VHC pendant cette phase précoce permettrait de limiter l'évolution de la maladie.

Dans de très rares cas (environ 0,1%), les patients déclarent une hépatite fulminante pendant cette période, affection fatale qui conduit à la destruction du foie et dont la seule alternative est la greffe hépatique (Bianco *et al.* 2003).

1.3.1.2 La résolution de l'infection

Suite à la phase aiguë, environ 20% des patients guérissent spontanément de l'infection. La **figure 3C** présente le schéma typique de la clairance virale : la virémie est précoce mais le virus est indétectable dans le plasma dès que les réponses T CD4+ et CD8+ se mettent en place, ce qui correspond également à une élévation des transaminases. La réponse immunitaire cellulaire de ces personnes est plus forte comparée à celle des malades chroniques (comparez Fig. 3C et 3A, B) (Kamal *et al.* 2004). Après la clairance virale, cette immunité cellulaire est conservée, alors que les anticorps anti-VHC sont perdus à long terme (Takaki *et al.* 2000). Il est intéressant de noter que la résolution spontanée de l'infection ne protège pas lors d'une réexposition ultérieure, mais réduit les risques de persistance (Mehta *et al.* 2002).

1.3.1.3 L'infection chronique

Chez près de 80% des personnes nouvellement infectées, le VHC va échapper au système immunitaire et établir une infection chronique, qui restera asymptomatique dans la grande majorité des cas. 10 à 20% des porteurs chroniques vont ensuite développer une cirrhose, qui évoluera en hépatocarcinome pour 1 à 5% des cas, dans un délai d'une vingtaine d'années. Une modélisation basée sur ces données établit qu'en l'absence de traitement, le

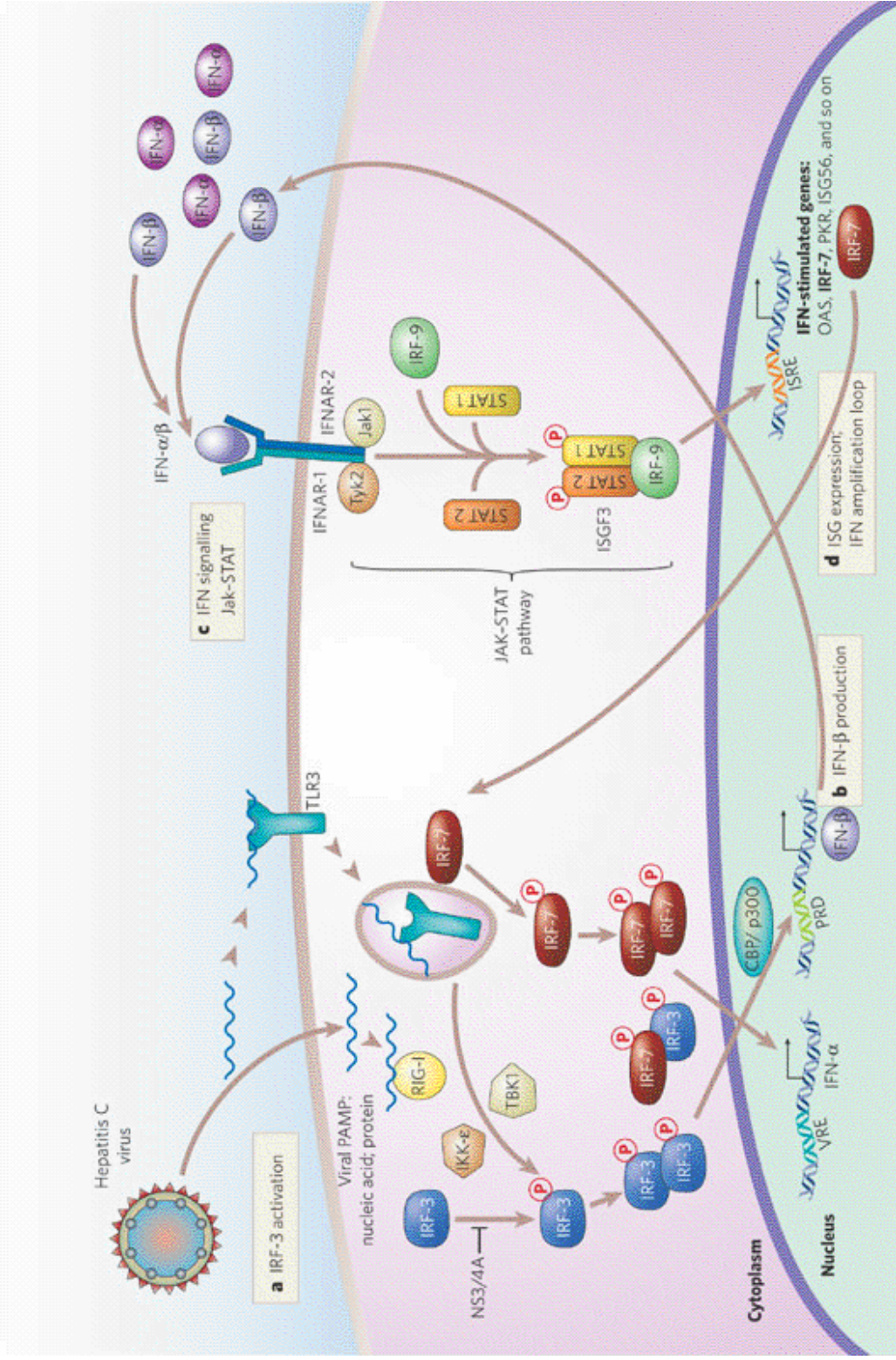


Figure 4. Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC (d'après Gale et Foy 2005.)

nombre de cancers du foie dus au VHC augmentera jusqu'en 2020 en France (Deuffic *et al.* 1999).

Deux cas de figure sont rencontrés lors de l'installation de la persistance (**Fig. 3A et B**). Dans le premier cas, la virémie est maximale très tôt et reste à un niveau important même après l'installation de la chronicité. La réponse cellulaire est inefficace : les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont présentes en faible nombre voire absentes. De même, les niveaux d'expression des transaminases sont bas. Dans le deuxième cas, la virémie est rapidement maximale et peut persister en l'absence d'une réponse cellulaire correcte. Les réponses T CD4⁺ et CD8⁺, relativement fortes, permettent un contrôle de la virémie et une augmentation des transaminases. Dès que la réponse T CD4⁺ s'estompe, la virémie remonte et l'infection chronique s'installe, malgré une réponse T CD8⁺ détectable. Dans les deux cas, c'est la qualité de la réponse cellulaire qui induit la persistance.

Cette réponse immunitaire adaptative insuffisante est la conséquence de la grande variabilité du VHC. En effet, au cours de l'infection chronique l'ARN-polymérase ARN-dépendante qui ne possède pas d'activité correctrice va générer de nombreux variants en répliquant le VHC. Les variants sont des formes proches, de même génotype, mais génétiquement différentes qui sont appelés quasi-espèces. L'apparition de ces quasi-espèces va compliquer l'action de l'immunité adaptative, la cellule hôte ne combattant pas un seul virus d'un génome donné mais des dizaines de déclinaisons de ce génome. Il a été montré que la résolution de l'infection est associée à un nombre réduit de quasi-espèces, alors que la chronicité et la résistance à l'interféron (IFN) sont corrélées à une augmentation de cette diversité (Farci *et al.* 2002). Ce phénomène est à l'origine de la notion de variants d'échappement du VHC, issus de la sélection des formes les plus adaptées à la persistance et à la résistance à l'IFN.

1.3.1.4 Défenses de l'hôte : la voie interféron

Lors de l'infection par le VHC, différentes voies de défense de la cellule sont activées (**Fig. 4**). Bien que le VHC soit un virus simple brin, il comporte des régions double brin qui sont reconnues comme des signatures PAMP (pathogen-associated molecular pattern). L'ARN viral est alors reconnu par les récepteurs PAMP RIG-1 (retinoic acid inducible gene 1) et TLR-3 (toll-like receptor 3) lors de l'infection. RIG-1 et TLR-3 activent deux voies différentes. RIG-1 peut reconnaître des motifs double brin du VHC présents dans les régions 5' et 3' non traduites (Sumpter *et al.* 2005). La signalisation liée à ce récepteur

dépend de régions homologues à CARD (caspase recruitment domain) qui activent IRF-3 (interferon regulatory factor) et NF- κ B (nuclear factor κ B). TLR-3, également activé par l'ARN double brin, dirige l'expression d'IRF-3 et NF- κ B via une protéine adaptatrice appelée TRIF (Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptator inducing INF- β). Ces deux voies aboutissent à la phosphorylation d'IRF-3 qui, sous forme de dimère, est transloqué dans le noyau où il va activer ses gènes cibles dont le gène codant l'IFN β . Ceci conduit à la sécrétion d'IFN β par la cellule infectée, sécrétion qui permet l'expression des gènes induits par l'IFN (ISG).

Par ailleurs, l'IFN β sécrété agit par voie paracrine et autocrine en se fixant aux récepteurs à l'IFN, qui activent la voie JAK-STAT. Dans cette voie, les protéines kinases Jak et Tyk2 associées au récepteur catalysent la phosphorylation de STAT. Cette phosphorylation active STAT qui peut alors s'associer sous forme de dimère STAT1-STAT2 à IRF-9, en formant des complexes STAT1-STAT2-IRF-9. Ces complexes se localisent dans le noyau de la cellule et activent la transcription des ISG (oligo adénylate synthetase, protéine kinase R (PKR),...). La voie JAK-STAT aboutit donc finalement à une seconde vague d'expression des ISG dans la cellule infectée. De nombreux récepteurs PAMP et partenaires de signalisation sont des ISG et leur production augmente en présence d'IFN. Un de ces ISG, IRF-7, va être exprimé en réponse à l'IFN, phosphorylé puis interagir avec IRF-3 en formant un hétérodimère qui va activer l'expression de l'IFN α . L'IFN α va diversifier la gamme des ISG exprimés et l'abondance des composants de la voie de signalisation des PAMP. C'est cette voie IFN α qui est utilisée pour le traitement actuel du VHC. L'IFN α induit également la maturation des cellules immunitaires effectrices, ce qui potentialise la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, modulant les défenses de la cellule et l'immunité adaptative (Sen 2001).

1.3.1.5 Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire

L'efficacité de l'échappement au système immunitaire, et donc l'apparition de la persistance de l'infection, est fortement liée à la capacité du VHC à perturber les réponses de l'hôte et à éviter les mécanismes de défenses antiviraux (Gale and Foy 2005). Le VHC agit notamment au niveau de plusieurs sites clés dans la voie de signalisation des récepteurs aux PAMP, dans la voie des récepteurs à l'IFN α ou β qui aboutit à l'expression des ISG, et au niveau des produits des ISG. D'autre part, la protéase NS3/4A est un antagoniste de l'activation d'IRF-3 et de l'expression de l'IFN β car elle bloque la signalisation RIG-1 et

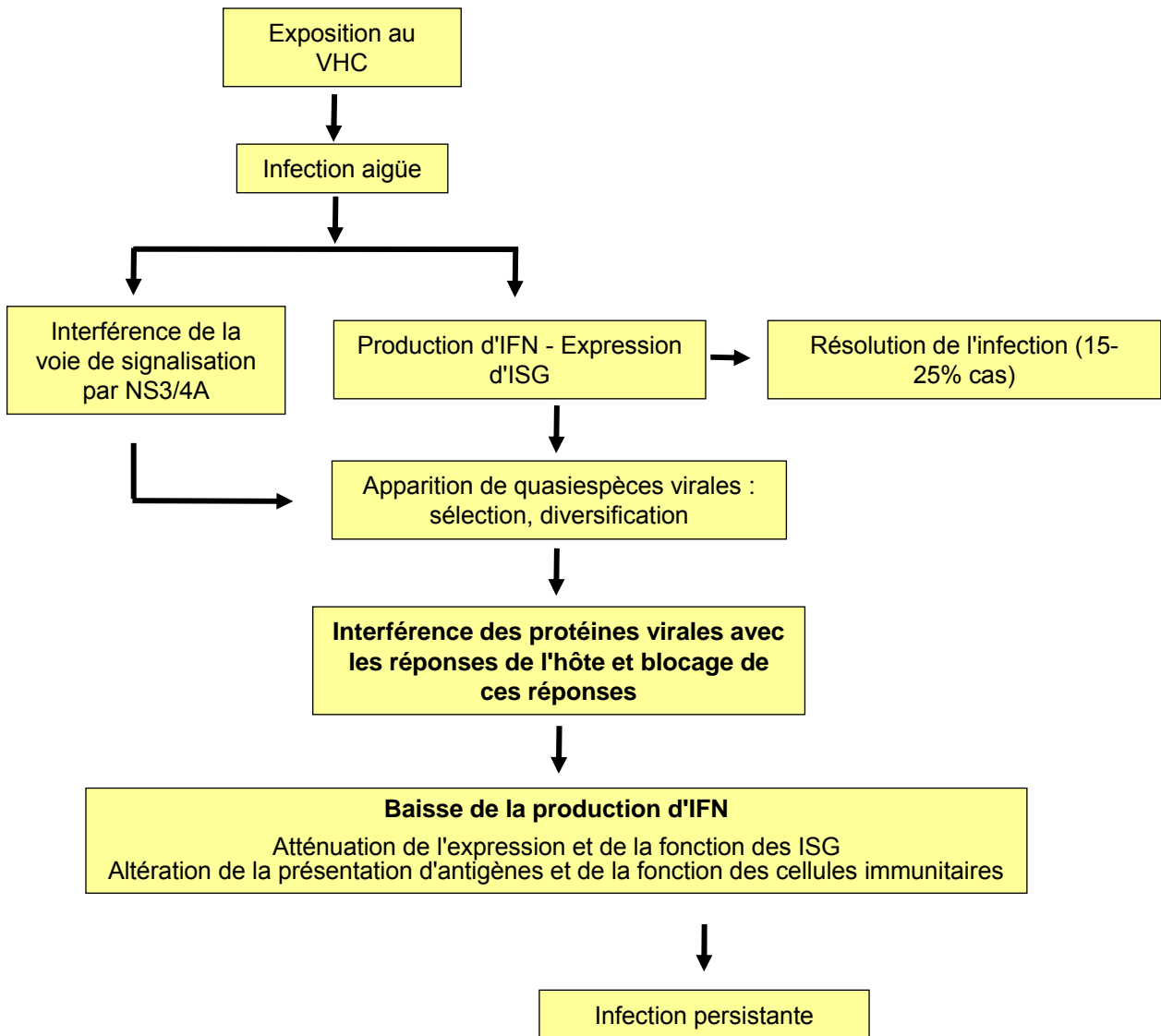


Figure 5. Les interactions VHC-hôte régulent la réponse de l'hôte et le devenir de l'infection (d'après Gale et Foy, 2005.)

1.3.2 Le foie, organe cible de l'infection

Lors de l'infection, le foie est composé à la fois d'hépatocytes sains et d'hépatocytes infectés, ces derniers produisent des virions en grande quantité et sont détruits par apoptose. Les virions néosynthétisés vont être relargués dans la circulation, certains vont infecter des hépatocytes sains, mais la plupart vont être détruits. Lors de l'infection chronique, un équilibre est maintenu entre l'infection de nouvelles cellules et la destruction des cellules infectées, permettant de garder un nombre d'hépatocytes infectés stable. De la même façon, la virémie est maintenue constante par l'établissement d'une balance entre le relargage de nouveaux virions dans la circulation et leur dégradation. La demi-vie des hépatocytes infectés est de 2,7 heures et on estime que 10^{12} particules sont produites et dégradées chaque jour dans un patient donné (Neumann *et al.* 1998).

1.3.2.1 La cirrhose

Lors de l'infection chronique VHC, la destruction progressive des hépatocytes et les mécanismes antiviraux de type inflammatoire aboutissent à la perte de l'architecture normale du foie. Cet état du foie est appelé cirrhose et est défini par une fibrose importante diffuse, par la présence de nodules de régénération et par une modification de l'architecture vasculaire. Le remplacement progressif des hépatocytes par ce tissu cicatriciel aboutit à la perturbation des principales fonctions du foie (insuffisance hépatique) et à une hypertension portale, conséquence de la mauvaise circulation du sang qui finit par s'accumuler dans les vaisseaux du tube digestif.

1.3.2.2 L'hépatocarcinome

Quel que soit l'agent étiologique, la transformation des hépatocytes se produit selon un mécanisme qui augmente le renouvellement cellulaire face à une lésion hépatique chronique, dans un contexte d'inflammation et de stress oxydatif. Ceci fait de la cirrhose du foie le risque majeur du développement d'un hépatocarcinome (HCC), 70 à 90% des HCC se développant dans un foie cirrhotique. En Europe, 70% des HCC sont reliés à une hépatite virale (B ou C), les 2/3 étant directement causés par le VHC (Brecht *et al.* 1998).

Les études des profils d'expression des gènes exprimés dans des tissus extraits d'HCC ont identifié un grand nombre de gènes surexprimés (principalement des gènes de croissance cellulaire) ou réprimés (principalement des gènes d'inhibition de croissance)

TLR-3. En effet, NS3/4A clive spécifiquement TRIF, une protéine adaptatrice reliant TLR-3 aux kinases responsables de l'activation d'IRF-3 et de NF- κ B (Li *et al.* 2005a). RIG-1 n'est pas directement clivé par NS3/4A, mais ce récepteur interagit avec une protéine mitochondriale impliquée dans la signalisation antivirale contenant également des domaines CARD. C'est cette protéine appelée Cardif ou MAVS, qui est clivée par la protéase et ce clivage aboutit à la suppression de l'induction de l'IFN β (Li *et al.* 2005b). Ceci a des conséquences multiples liées à la diminution de la production d'IFN dans les hépatocytes et au blocage de la voie d'amplification des PAMP liée à l'IFN. Parmi les ISG, la modification de l'expression des composants du complexe majeur d'histocompatibilité aboutit à la perturbation de la présentation des antigènes. La perte de l'activation de NF- κ B conduit à la modification de ses activités, notamment à la dérégulation d'expression de nombreuses cytokines et chemokines. Pour résumer, les conséquences de la diminution de la sécrétion de l'IFN sont nombreuses au niveau signalisation et réponse ISG, indiquant de multiples stratégies du VHC pour échapper aux effets de cette molécule. Il a été suggéré que le VHC inhiberait partiellement la voie IFN β via le clivage de MAVS/Cardif sans interférer dans la voie JAK-STAT, mais qu'une voie supplémentaire située en amont du clivage par la protéase serait responsable de l'inhibition de cette voie de façon NS3/4A indépendante (Cheng *et al.* 2006). La nature de cette voie reste à définir.

Les protéines virales jouent un grand rôle dans la dérégulation des réponses de la cellule hôte. L'action de la protéase NS3/4A a été décrite dans le paragraphe précédent. Une inhibition de la voie JAK-STAT est généralement associée à l'expression des protéines du VHC, plus spécifiquement de la fonction de STAT indépendamment de la phosphorylation. Ceci a été relié à l'augmentation de l'expression de SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3) en réponse à la protéine core (Bode *et al.* 2003). Les SOCS-3 sont des inhibiteurs de la voie JAK-STAT qui rétrorégulent la signalisation des récepteurs à l'IFN α/β , mais leur rôle exact dans l'infection VHC n'est pas connu. NS5A est un antagoniste de l'IFN et semble réguler l'expression des ISG (voir II.3.2.5). Les protéines NS5A et E2 sont également impliquées dans l'inhibition de la PKR qui intervient à de nombreux niveaux dans les cascades de signalisation (Gale *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1999). Cette inhibition pourrait alors limiter les phosphorylations nécessaires au bon fonctionnement de la voie IFN et permettre au VHC d'échapper à ce système de défense. Le modèle communément admis de l'établissement d'une infection chronique est présenté en **figure 5**.

(Thorgeirsson *et al.* 2006). Cependant, aucune signature spécifique pouvant expliquer l'oncogenèse provoquée par le VHC n'a été mise en évidence.

Du fait des lésions hépatiques causées par le virus (cirrhose terminale et hépatocarcinome), l'hépatite C est la première indication de transplantation du foie. Malheureusement, la transplantation ne permet pas la guérison du patient : la réinfection du greffon est quasi systématique, et 90% des foies greffés présentent une récurrence histologique à 5 ans post greffe (Berenguer 2002). Cette évolution peut être améliorée en traitant le receveur par des traitements antiviraux avant et/ou après la greffe.

1.3.3 Pathologies extra hépatiques

En plus des hépatocytes, les lymphocytes B et les cellules dendritiques sont infectables par le VHC (Navas *et al.* 2002; Goutagny *et al.* 2003; Sung *et al.* 2003). Ces cellules ont été proposées comme cellules réservoirs du VHC, et pourraient supporter la réplication du VHC lors de l'infection naturelle.

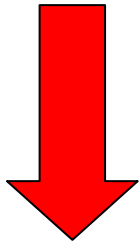
Les manifestations extra-hépatiques associées au VHC sont d'origine immunologique. Les atteintes cliniques observées sont essentiellement cutanées et musculo-articulaires (15 à 20%). Les signes biologiques sont dominés par la cryoglobulinémie et la présence d'auto-anticorps.

1.3.3.1 La cryoglobulinémie mixte

La cryoglobulinémie est définie par la présence d'immunoglobulines (Ig) circulantes qui précipitent de façon réversible quand la température est inférieure à 37°C. Dans le cas de la cryoglobulinémie mixte (CM), plusieurs types d'anticorps sont présents. *In vivo*, la précipitation des Ig peut causer un syndrome vasculaire si elle a lieu dans des petits vaisseaux sanguins. Dans la majorité des cas, la CM se manifeste par une éruption cutanée (purpura), une fatigue, des arthralgies et des ulcères des jambes mais des cas d'atteintes rénales, de neuropathies ou de syndrome de Raynaud ont également été décrits (Ferri and Mascia 2006). Bien que la cryoglobulinémie puisse être observée dans diverses maladies auto-immunes ou infectieuses, l'infection par le VHC est de loin sa cause la plus fréquente. En effet, 45 à 55% des patients présentant une CM sont infectés par le VHC (Ferri *et al.* 2002; Agnello and De Rosa 2004).

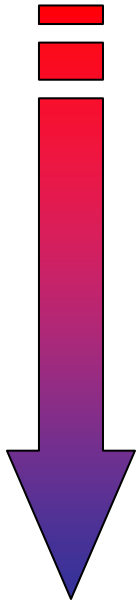
III. Résultats soumis à publication

Le but de notre étude est de comprendre la traduction d'ARFP dans le contexte cellulaire en déterminant quelle(s) forme(s) est (sont) effectivement traduite(s). Pour cela, nous avons mesuré l'efficacité de la traduction de la protéine ARFP par rapport à la synthèse de la protéine core avec laquelle elle partage la même séquence nucléotidique. Notre but était d'identifier des signaux inhérents à la séquence du virus favorisant la synthèse de la protéine ARFP (tige-boucles d'ARN, structure en pseudo-nœud). Pour cela, nous avons construit des plasmides d'expression eucaryote contenant différentes longueurs de la séquence de la protéine core/ARFP en fusion avec le gène rapporteur luciférase dans les trois cadres de lecture. Ainsi, l'activité luciférase mesurée après transfection de chaque construction ne rend compte que de la traduction dans la phase de lecture considérée (la polyprotéine, ici la protéine core dans la phase de lecture 0, la protéine ARFP issue du décalage de cadre de lecture et/ou de l'initiation interne dans la phase +1, la phase -1 en contrôle). Avec ce système, nous avons mesuré l'impact de la séquence ARN sur la traduction, visualisé et identifié ARFP par western blot, et finalement mis en évidence les facteurs viraux responsables de la régulation de la traduction de cette protéine.



1991

Transfusion sanguine
Injection de produits dérivés du sang
Vaccinations



Toxicomanie intraveineuse (60%)
Infections nosocomiales
Tatouage et piercing
Transmission verticale, transmission sexuelle
Modes de transmission inconnus (15 à 20%)

Figure 6. Modes de transmission du VHC

1.3.3.2 Désordres lymphoprolifératifs

L'autre manifestation extrahépatique la plus souvent rencontrée lors de l'infection par le VHC est la production d'auto-anticorps (facteurs anti-nucléaires, anticorps anti-cardiolipines, anticorps anti-microsomes du foie/rein, facteurs rhumatoïdes) (Zauli *et al.* 1999). Si la production d'auto-anticorps est le plus souvent sans conséquence, elle peut conduire à des maladies auto-immunes comme les hépatites auto-immunes de types 1 ou 2, le syndrome de Sjôgren, le lichen plan et la thyroïdite auto-immune (Vassilopoulos and Calabrese 2005). D'autres symptômes sont associés au VHC mais seulement sur la base des données épidémiologiques comme la porphyrie cutanée tardive. L'INF α , traitement de base de l'hépatite C chronique, est un inducteur d'auto-immunité et peut donc aggraver certaines de ces manifestations (Bayraktar *et al.* 1997).

1.4 Modes de transmission

1.4.1 La transfusion sanguine

La transfusion sanguine est le mode de transmission le plus efficace du VHC (**Fig. 6**). Dans les pays industrialisés, de nombreuses mesures ont été prises au cours des dernières années pour réduire le risque de transmission de ce virus. En France, le dépistage systématique des dons du sang a été instauré en 1991. Ces mesures incluent le test systématique des dons du sang par la mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT), dont l'élévation est un signal de souffrance hépatique, la sérologie anti-VHC et la détection de l'ARN viral. La transfusion est maintenant sécurisée dans la plupart des pays industrialisés (Busch *et al.* 2003).

Aux Etats-Unis, la réduction de l'incidence des infections VHC par la transfusion a coïncidé avec l'adoption d'un système de don du sang basé sur le volontariat et non sur un paiement : l'incidence a diminué d'un facteur 3 quand le pourcentage de donneurs rémunérés est passé de 91 à 4% (Seeff *et al.* 1975). Cependant, la plupart des transfusions sanguines dans les pays en voie de développement sont encore réalisées à partir de donneurs payés. La mise en place du don volontaire se heurte à de nombreux obstacles (croyances culturelles, régulation de l'utilisation du sang, mise en place de banques,...). De plus, une grande majorité des pays en voie de développement ne testent pas la présence du VHC dans les dons du sang : dans ces pays, la proportion des échantillons non criblés est de 43% (World Health

Organization 1998-1999). A titre d'exemple, une étude réalisée dans 12 pays d'Amérique Latine a montré que plus de la moitié des produits sanguins étaient positifs pour le VHC (Schmunis *et al.* 2001), prouvant l'intérêt majeur de ces tests systématiques. En Inde, alors que la prévalence est d'environ 5% et que le criblage anti-VHC est institué par la loi, les tests ne sont pas réalisés en raison de contrainte financière (Ray *et al.* 2000). Beaucoup d'efforts sont donc encore nécessaires pour que la transfusion sanguine soit sécurisée au niveau mondial.

1.4.2 La toxicomanie

L'injection de drogue est le mode principal de transmission du VHC dans les pays développés. La transmission du VHC est plus efficace que celle d'autres virus car elle nécessite un nombre moins important de contacts par échanges de seringues ou d'autre matériel d'injection (Murray *et al.* 2003). On peut noter que même l'eau de rinçage des seringues a été impliquée dans des cas de transmission (Thorpe *et al.* 2002). Dans des pays tels que les Etats-Unis et l'Australie où la prévalence la plus forte se situe dans une classe d'âge moyen, l'utilisation de drogues injectables est le mode d'infection dominant et représente de 68 à 80% des infections répertoriées (Alter 2002; Dore *et al.* 2003). La prévalence de l'infection VHC parmi les individus consommant de la drogue depuis plus de 6 ans est de 64-94% selon les études (Thomas *et al.* 1995; Diaz *et al.* 2001). A la fin des années 80, environ 65% des personnes s'injectant de la drogue depuis moins d'un an étaient séropositives (Garfein *et al.* 1996). Des études plus récentes donnent des prévalences de l'ordre de 20 à 46% dans une population consommant de la drogue depuis moins de 5 ans (Miller *et al.* 2002; Des Jarlais *et al.* 2003). En Europe, l'injection de drogues est également identifiée comme le risque principal d'infection par le VHC. En Norvège par exemple, 67% des cas de VHC ont été reliés à l'usage de drogue (Dalgard *et al.* 2003). De même ; environ 60% des infections VHC aiguës enregistrées entre 1994 et 1996 en Italie chez des patients de 15 à 24 ans ont été attribuées à l'injection de drogues (Mele *et al.* 2000). Finalement, en France, une étude réalisée parmi les donneurs de sang volontaires testés positifs pour le VHC a montré que la grande majorité des cas étaient liés à la drogue (Elghouzzi *et al.* 2000).

D'autre part, le risque lié à l'utilisation de drogues non-injectables reste controversé. Une étude réalisée à New York dans une cohorte d'usagers de drogues montre une prévalence du VHC de 60-100% contre 5% selon que les individus s'injectent la drogue ou non (Fuller *et al.* 2004). Bien qu'il y ait des preuves épidémiologiques en faveur d'une transmission du

VHC à la fois orale et intra-nasale, la plupart des études ne concluent pas en ce sens (McMahon and Tortu 2003). L'ARN viral a toutefois été détecté dans les sécrétions nasales d'individus inhalant des drogues, indiquant que le partage de matériel servant à la prise de drogue en intra-nasal pourrait être une voie d'infection du VHC (McMahon *et al.* 2004).

1.4.3 Risque lié aux gestes thérapeutiques

Le risque de transmission du VHC lors d'injections thérapeutiques est presque nul dans les pays industrialisés mais reste important dans les pays en voie de développement. Dans ces pays, l'utilisation de seringues stériles n'est pas systématique et les injections sont souvent réalisées hors du circuit médical par des personnes non-professionnelles (Hauri *et al.* 2004). Dans ces conditions, un individu peut recevoir de multiples injections contaminées au cours de sa vie, cumulant les risques d'être infecté par le VHC. Le plus fort taux de prévalence mondial est trouvé en l'Egypte (15-20%), où des seringues en verre contaminées ont été utilisées lors de campagnes nationales de traitement contre la bilharziose entre 1960 et 1987 (Frank *et al.* 2000). D'autres cas ont été documentés en Inde, où suite à des traitements contre le kal-azar 31% des patients ont été atteints par le VHC (Singh *et al.* 2000), au Pakistan (Luby *et al.* 1997) et à Taiwan (Lin *et al.* 2003). L'organisation mondiale de la santé estime qu'en 2000 ces injections contaminées ont été responsables de 2 millions de nouveaux cas de VHC dans le monde (Hauri *et al.* 2004). Les épidémiologistes ont estimé la charge de la maladie attribuée à ces injections, et ont trouvé les plus hauts taux de réutilisation de seringues en Asie du sud et dans le Pacifique ouest (Hutin *et al.* 2003). Pour l'instant, aucune étude examinant le lien entre réutilisation de seringues/contamination par le VHC n'a été faite dans ces pays, mais les données actuelles laissent présager une situation des plus inquiétantes.

D'autres cas de contamination liés à des gestes thérapeutiques ont également été décrits. En 1994, un cas de contamination en masse a été décrit en Irlande, chez de jeunes femmes ayant été traitées au cours de leur grossesse et après leur accouchement par des injections d'immunoglobulines anti-D contaminées. Ces immunoglobulines sont d'origine humaine, et toutes les infections observées ont été attribuées à une seule femme présentant une infection aiguë (Fanning 2002). Un cas similaire a été décrit en Allemagne, en 1978, quand près de 2000 femmes ont été transfusées post-accouchement par des IgG contaminées provenant d'une même source (Takaki *et al.* 2000). D'autres cas d'infections nosocomiales par le VHC ont été régulièrement démontrés lors d'actes comme l'endoscopie ou la dialyse, mais aussi chez les professionnels de santé (Sanchez-Tapias 1999). Dans les pays

industrialisés, de nombreuses mesures ont été prises pour assurer à la fois la stérilité du matériel chirurgical et la sécurité du soignant (Henderson 2003) et ont ainsi permis de réduire considérablement le risque de contamination nosocomiale.

1.4.4 Tatouage, piercing et autres modes de contamination

En plus des modes de transmission détaillés plus haut, il existe beaucoup d'activités impliquant l'exposition percutanée au sang ou à des fluides corporels qui sont des portes d'entrée possibles du VHC. On peut citer des pratiques religieuses ou cosmétiques comme le tatouage, le piercing, les scarifications religieuses, la circoncision, le rasage chez le barbier et l'acupuncture. Les données recueillies sont encore trop faibles pour déterminer la contribution de ces pratiques à la totalité des cas de VHC répertoriés dans le monde. Les premières études réalisées sur ce sujet ont montré une relation entre l'infection par le VHC et le tatouage (Ko *et al.* 1992; Mariano *et al.* 2004), l'acupuncture, le perçage d'oreilles (Sun *et al.* 1999) et le piercing (Mele *et al.* 1990). Suite aux actions de prévention menées dans les salons de tatouage et de piercing, ces pratiques sont à présent réalisées dans des conditions d'hygiène appropriées dans les pays industrialisés (Hellard *et al.* 2003) conduisant à la disparition de ces modes de contamination (Hwang *et al.* 2006).

1.4.5 La contamination sexuelle

Les relations sexuelles avec un partenaire infecté et de multiples partenaires sont identifiées comme un risque de transmission du VHC (Alter *et al.* 1989). On estime que la transmission sexuelle est impliquée dans 20% des cas non expliqués (Ghosn *et al.* 2005). Cependant, ce mode de transmission est beaucoup moins efficace que dans le cas d'autres virus transmis sexuellement. Parmi les individus menant des relations monogames de longue durée, le risque de transmission du VHC par voie sexuelle est très faible (Terrault 2002; Vandelli *et al.* 2004). Ces personnes ont un risque d'acquisition du VHC de 0 à 0,6% par an, contre 0,4 à 1,8% par an pour celles qui fréquentent de multiples partenaires. L'ARN viral est détectable dans les fluides génitaux (Bourlet *et al.* 2002; Belec *et al.* 2003) mais il n'y a aucune preuve que du virus infectieux soit présent dans les sécrétions.

1.4.6 La transmission verticale

Suite à la sécurisation de la transfusion sanguine, la transmission verticale est désormais le mode de transmission du VHC le plus fréquent chez les enfants (Bortolotti *et al.* 1998). Le taux de transmission retrouvé dans la plupart des études est de l'ordre de 5% (Ohto *et al.* 1994; Conte *et al.* 2000), mais varie selon l'étude considérée (Tovo *et al.* 1997; Gibb *et al.* 2000). Il est admis que la virémie maternelle est un facteur de risque déterminant (Resti *et al.* 1998). Les autres facteurs de risque comprennent la co-infection de la mère par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (Tovo *et al.* 1997; Gibb *et al.* 2000), l'usage de drogue (Resti *et al.* 2002), la présence d'ARN viral dans les cellules mononucléées du sang (PBMC) (Azzari *et al.* 2000). La relation entre l'avancée de la maladie chez la mère et le risque de transmission verticale n'est pas très documentée. Seul un niveau d'ALAT élevé a pu être mis en cause dans la transmission mère-enfant (Indolfi *et al.* 2006). Un tel niveau d'ALAT peut indiquer une atteinte hépatique plus sévère et une charge virale plus élevée, facteurs impliqués dans le risque de transmission. Le dosage de l'ALAT, simple et peu coûteux, peut permettre d'identifier précocement les mères présentant un haut risque de transmission verticale.

1.4.7 La transmission intrafamiliale

Le VHC ne se transmet pas par les éternuements, les accolades, la toux, l'eau ou les aliments, l'utilisation commune de la vaisselle, ou lors des contacts sociaux ordinaires. Cependant, certaines études ont suggéré que le fait de vivre avec des individus contaminés par le VHC pouvait être un facteur de risque d'infection (Saltoglu *et al.* 1998; Alvarez-Munoz *et al.* 2001) et ceci qu'il y ait contact sexuel ou non (Ackerman *et al.* 2000). D'un point de vue épidémiologique, cela suggère que l'infection est possible par des contacts avec des fluides corporels autres que le sang. La présence de l'ARN viral dans différents fluides a été étudiée et démontrée dans l'urine (Liou *et al.* 1992), la sueur (Ortiz-Movilla *et al.* 2002) et la salive (Takamatsu *et al.* 1990). Cependant, la présence de particules infectieuses n'a pu être démontrée dans aucun de ces cas. Le partage d'ustensiles comme les rasoirs est soupçonné dans ces contaminations, sans qu'aucune preuve n'ait pu être apportée. Des données supplémentaires sont donc nécessaires pour documenter la transmission intrafamiliale du VHC.

1.4.8 Prévenir la transmission du VHC

En l'absence de vaccin, l'OMS conseille de suivre les précautions suivantes pour prévenir l'infection:

- Dépistage des dons de sang et des dons d'organes.
- Inactivation du virus dans les produits dérivés du plasma.
- Application systématique des mesures de sécurité dans les établissements de soins, de santé, y compris la stérilisation du matériel médical et dentaire.
- Information du public et des agents de santé pour limiter le recours de façon abusive aux injections et faire en sorte qu'elles soient pratiquées en toute sécurité.
- Conseils aux consommateurs de drogues injectables et aux personnes ayant des pratiques sexuelles dangereuses afin d'éviter les risques de contamination.

1.5 Facteurs de risque

Les facteurs qui influencent l'évolution de l'hépatite C ne sont pas encore tous connus. En plus des facteurs viraux et de la qualité de la réponse immunitaire du patient, certains comportements ont été associés à un mauvais pronostic de la maladie, comme l'alcool et l'insulino-résistance.

1.5.1 Le facteur alcool

L'alcool est un facteur suffisant à la formation d'une cirrhose. Lors d'une infection par le VHC, la consommation d'alcool accélère la formation de fibroses dans le foie selon un mécanisme encore mal compris mais qui implique l'apoptose des hépatocytes et le stress oxydatif (Pianko *et al.* 2001; Rigamonti *et al.* 2003). Les lésions hépatiques sont reliées à la quantité totale (pendant la durée de l'étude) et journalière d'alcool, mais le facteur déterminant semble être la fréquence de boisson plutôt que la quantité d'alcool ingérée (Westin *et al.* 2002). La consommation occasionnelle est donc probablement moins délétère que la consommation journalière de quantités faibles à modérées. Il est cependant recommandé aux malades du VHC de s'abstenir d'ingérer de l'alcool.

1.5.2 Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un des termes utilisés pour décrire un ensemble de perturbations métaboliques qui prédispose fortement au développement et à la progression de l'athérosclérose, une rigidification des artères par dépôt de graisses à leur surface. L'obésité et la résistance à l'insuline sont fortement impliquées dans ce syndrome, et de nombreuses personnes touchées développent ultérieurement un diabète de type 2 (non insulino-dépendant). En clinique, une forte incidence de l'insulino-résistance a été retrouvée parmi les patients contaminés par le VHC qui ne répondent pas au traitement (Tarantino *et al.* 2006). Une relation entre le syndrome métabolique et le VHC est fortement soupçonnée, et un régime amaigrissant est souvent proposé aux patients souffrant de ce syndrome, en plus des traitements anti-VHC.

1.6 Dépistage du VHC

Les tests diagnostiques de l'infection au VHC permettent de sécuriser les dons de sang et de plasma, et d'améliorer la prise en charge précoce des patients. Ces tests appartiennent à deux grandes catégories : les tests sérologiques qui détectent les anticorps anti-VHC et les tests moléculaires qui détectent et quantifient l'ARN viral et/ou déterminent le génotype du virus infectant le patient.

Les tests diagnostiques utilisés en première intention sont basés sur la détection d'anticorps spécifiques du VHC (anti-VHC EIA pour enzyme immunoassay). Le test EIA présente beaucoup d'avantages : facilité d'utilisation et d'automatisation, coût relativement faible et grande spécificité (Colin *et al.* 2001). L'EIA de 3^e génération détecte la présence d'anticorps dirigés contre les protéines core, NS3, NS4 et NS5. L'EIA permet de détecter plus de 98% des porteurs chroniques mais le taux de détection n'est que de l'ordre de 50% à 70% pendant la phase aiguë. Deux autres limites sont à reprocher à ce test. D'une part, il ne permet pas de distinguer les infections actives d'infections résolues, générant des résultats faussement positifs. D'autre part, le test peut être faussement négatif comme dans le cas d'immunodépression sévère ou d'hépatite aiguë C très précoce en raison du délai d'apparition des anticorps.

Un dosage EIA même faiblement positif est confirmé systématiquement par un test d'un autre fournisseur, ce qui permet de réduire le nombre de résultats indéterminés et de faux positifs.

En cas de réponse positive à un de ces deux tests, on recherche le génome viral circulant, toujours dans le sérum du patient. Ceci peut être réalisé qualitativement par réaction reverse de polymérisation en chaîne (RT-PCR) ou quantitativement par PCR quantitative en temps réel, ou par dosage de l'ARN viral par dosage de l'ADN branché (Lunel *et al.* 1995). Comme le niveau d'expression de l'ARN viral est stable lors de l'infection chronique, les tests quantitatifs peuvent également être utilisés pour déterminer l'efficacité d'un traitement sur la virémie du patient. Il est également important d'identifier le génotype, car l'efficacité des traitements est génotype-dépendante. Ceci est réalisé par séquençage de régions spécifiques de 5'NTR pour le génotypage et de NS5B pour le sous-typage.

Lors d'une hépatite C aiguë, le délai moyen de séroconversion est de 2 à 3 mois, soit 2 à 3 semaines après le pic de transaminases. Durant cette période, seules la PCR qualitative (amplification de l'extrémité 5' non traduite du VHC) ou la détection de la protéine core dans le sérum permettront d'établir le diagnostic d'hépatite aiguë C. En cas de guérison spontanée, alors que la recherche du VHC par PCR est négative, la sérologie virale C reste positive pendant un temps variable selon les individus puis se négativise également.

1.7 Traitements et nouvelles thérapeutiques

Le traitement actuellement dispensé aux malades de l'hépatite C est une combinaison d'une forme stabilisée de l'interféron, l'interféron α pégylé, et d'un analogue nucléosidique, la ribavirine. L'IFN a été choisi d'abord empiriquement puisqu'il s'agit d'un antiviral à large spectre utilisé pour traiter de nombreuses maladies virales, aiguë ou chroniques, comme les hépatites A, B et delta (Hoofnagle *et al.* 1986). La ribavirine a un large spectre d'action contre les virus à ARN et ADN, et en particulier contre les virus de la famille des *Flaviviridae* (Reichard *et al.* 1991). La combinaison de ces deux molécules, établie en 2002 par le NIH Consensus Development Conference on Management of Hepatitis C, permet de traiter environ 80% des patients infectés par un VHC de génotype 2 ou 3 et la moitié de ceux infectés par un virus de génotype 1 (Fried *et al.* 2002). De telles données ne sont pas encore disponibles pour les génotypes 4, 5 et 6. L'efficacité limitée de ce traitement et ses lourds effets secondaires (fièvre, nausée, dépression...) rendent toutefois urgente la découverte de molécules plus spécifiques.

Des formes d'IFN et de ribavirine mieux supportées sont en phase III de test clinique. (viramidine, IFN α lié à l'albumine...). D'autre part, de nombreuses molécules inhibant

Molécules ciblant le VHC

Nom du composé	Société	Essais cliniques	Cibles	Mode d'action
BILN 2061 (Ciluprevir)	Boehringer-Ingelheim	Phase II *	protéase NS3-4A	Produit dérivé d'un inhibiteur de sérine protéase
VX-950	Vertex/Mitsubishi	Phase Ib	protéase NS3-4A	Inhibiteur de sérine protéase se liant de manière réversible
NM283 (Valopicitabine)	Idenix/Novartis	Phase II	polymérase NS5B	Analogue nucléosidique (arrêt de traduction)
JTK-103	Japan Tobacco	Phase II	polymérase NS5B	Inhibiteur allostérique non nucléosidique
HCV-796	ViroPharma/Wyeth	Phase Ia	polymérase NS5B	Inhibiteur allostérique non nucléosidique

Développement interrompu à cause de la cardiotoxicité chez le singe

Immuno-modulateurs

Nom du composé	Société	Essais cliniques	Cibles	Mode d'action
Actilon (CpG-10101)	Coley Pharmaceutical Group	Phase Ib	Toll-like récepteur 9	Immuno-modulateurs
ANA245 (Isatoribine)	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ib	Toll-like récepteur 7	Immuno-modulateurs
ANA975	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ia	Toll-like récepteur 7	Immuno-modulateurs (pro-drogue d'ANA245)

Tableau 1. Aperçu des thérapeutiques anti VHC au cours de développement clinique (d'après De Francesco et Miliaccio, 2005).

spécifiquement le VHC sont actuellement développées (**tableau 1**). Le développement du premier inhibiteur de la protéase du VHC NS3/4A testé, BILN 2061, a été interrompu en raison d'une toxicité cardiaque chez le singe. VX-950, un inhibiteur des protéases à sérine, cible NS3/4A. NM283, un analogue nucléosidique, JTK-103 et HCV-796, deux inhibiteurs allostériques non nucléosidiques, inhibent l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B. Des molécules ciblant l'IRES, p7, la protéase à cystéine NS2/3 ou l'hélicase NS3 sont également à l'étude. En plus des inhibiteurs ciblant spécifiquement le VHC, des immunomodulateurs des récepteurs toll-like (TLR) 7 et 9 ont été développés, comme Actilon, ANA245 et ANA 975. Les récepteurs TLR-7 et TLR-9 sont exprimés à la surface des lymphocytes T et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC), TLR-7 est également présent sur les cellules dendritiques myéloïdes. Leur stimulation aboutit à une synthèse importante d'IFN α et β , et l'utilisation d'agonistes de ces récepteurs en thérapie du VHC permettrait de relancer la réponse immunitaire des patients. Les premiers résultats de ces traitements sont encourageants (De Francesco and Migliaccio 2005).

1.8 Essais vaccinaux

En plus de traitements efficaces permettant de soigner les malades du VHC, un vaccin préventif serait nécessaire à l'éradication de la maladie. Actuellement, de nombreuses pistes sont explorées et sont résumées dans le **tableau 2A**. Les tests actuels sont basés sur les propriétés antigéniques des protéines du VHC, qui sont exprimées sous différentes formes (ADN, protéines exprimées seules, à la surface de pseudoparticules du VHC ou par un virus recombinant,...). Les vecteurs viraux recombinants ont été beaucoup utilisés dans la recherche d'un vaccin contre le VIH et l'expérience issue de ces travaux a été appliquée au VHC. Ces vecteurs amplifient la réponse immunitaire car ils expriment le transgène de façon très efficace. La plupart des candidats vaccins sont encore en phase d'optimisation, de manière à obtenir des réponses humorales et cellulaires optimales. Du fait de la grande variabilité génétique du virus, la construction d'un vaccin efficace contre tous les génotypes du VHC est un véritable challenge. Un vaccin global et efficace nécessitera probablement la mise au point d'un mélange d'immunogènes provenant de divers génotypes du VHC. Les tests cliniques devraient fournir de précieuses informations pour la poursuite des travaux vaccinaux, et sont porteurs de beaucoup d'espoirs (Houghton and Abrignani 2005).

A.

Vaccin	Mode d'action	Essais cliniques
E1/E2 recombinantes + adjuvant (eau et huile)	Protège les chimpanzés contre l'infection chronique	Phase 1
Prime avec de l'ADN et boost avec des protéines (core, E1 et E2)	Protection ou amélioration dans le modèle chimpanzé	Pré-clinique
HCV-LPs recombinantes core, E1 et E2	Hautement immunogène dans la souris et le babouin	Pré-clinique
E1 recombinante dans l'alun	Active une réponse humorale et cellulaire chez l'humain	Phase 1/2
Virus Ankara de la vaccine modifié exprimant E1 et E2	Induit une réponse de type TH1 dans la souris HLA A2.1	Pré-clinique
Virus de la forêt de Semliki exprimant NS3	Induit une réponse cytotoxique spécifique contre NS3 dans la souris	Pré-clinique
ADN codant E1 et E2 dans des particules poly-lactide-co-glycolide	Augmente le titre d'anticorps anti-E1/E2 chez la souris	Pré-clinique
Virus ovin atadénovirus inactivé exprimant NS3	Forte réponse de type TH1 dans la souris	Pré-clinique
Prime avec toutes les protéines du VHC sous forme ADN et boost avec un virus canarypox	Réponse immunitaires cellulaires TH1 importantes dans la souris	Pré-clinique
Virus de la vaccine exprimant tous les gènes du VHC	Tests chez le chimpanzé en cours	Pré-clinique
Particules alphavirales inactivées exprimant E1/E2 et les gènes NS	Tests chez la souris en cours	Pré-clinique

B.

Vaccin	Mode d'action	Essais cliniques
Glycoprotéine E1 dans l'alun	Augmente la réponse immunitaire cellulaire et humorale contre E1 chez les patients VHC	Phase 1/2
Cocktail de peptides dans un adjuvant	Augmente la réponse de lymphocytes T CD4+ et CD8+	Phase 2
Glycoprotéines E1 et E2 dans un adjuvant (eau + huile)	Prévient l'infection chez les chimpanzés. Augmente le titre d'anticorps contre E1 et E2 chez les chimpanzés présentant une infection chronique	Phase 1b
Protéine core + ISCOMATRIX® (adjuvant)	Active la réponse contre des épitopes de core de type CD4+ Th1 et CD8+ cytotoxiques chez le macaque et chez l'humain non infecté.	Phase 1b
Polyprotéine NS3-NS4-NS5-core + ISOMATRIX® (adjuvant)	Active la réponse de type CD4+ Th1 et CD8+ cytotoxiques chez le chimpanzé après infection avec un VHC hétérologue (virémie et hépatite diminuées)	Pré-clinique
Adénovirus recombinant puis NS3, 4 et 5 sous forme ADN	Active les lymphocytes CD4+ et CD8+. Tests chez le chimpanzé en cours	Pré-clinique
Levures exprimant core et NS3 inactivées par la chaleur	Active les lymphocytes CD4+ et CD8+ dans la souris	Pré-clinique

Tableau 2. Candidats vaccins prophylactiques (A) et thérapeutiques (B) (d'après Houghton et Abrignani, 2005).

De même, plusieurs vaccins thérapeutiques sont à l'étude, en raison de l'efficacité limitée des traitements proposés actuellement. Des thérapies immunes pourraient améliorer les réponses contre le virus, ce qui permettrait de limiter l'émergence de mutants d'échappement. Les vaccins thérapeutiques à l'étude (**tableau 2B**) sont également basés sur l'expression de protéines virales, mais leur efficacité est encore peu documentée. L'utilisation de la glycoprotéine E1 et de l'adjuvant alun semble prometteuse. Le vaccin thérapeutique idéal activerait tous les pans de la réponse immunitaire de la cellule, et il est donc envisagé de combiner ces vaccins et les immunomodulateurs de TLR-7 et 9, de façon à stimuler à la fois les réponses immunitaires innées et adaptatives.

En l'absence de thérapie efficace et d'un vaccin, la recherche fondamentale sur le VHC est essentielle afin de comprendre à quelle étape le virus peut être bloqué dans l'organisme, et ainsi être éliminé.

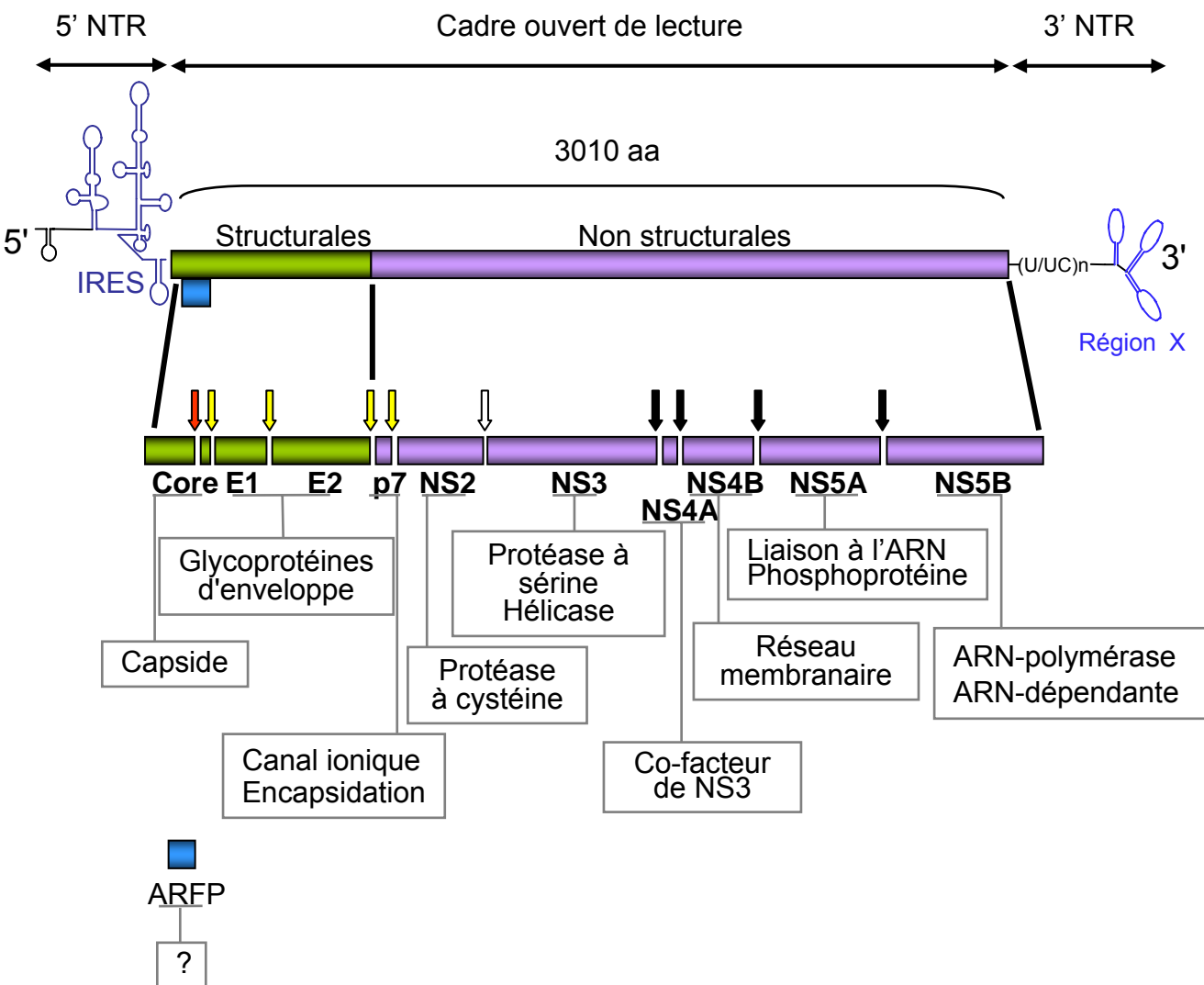


Figure 7. Organisation génomique du VHC et fonctions des protéines virales. La traduction du génome du VHC produit une polyprotéine de 3010 aa qui est clivée par les protéases cellulaires (signal peptidase, flèche orange, et signal peptidase, flèches jaunes) pour libérer les protéines structurales, la jonction NS2/NS3 est clivée par l'activité protéase à cystéine de NS2 (flèche blanche) et les autres protéines non structurales sont maturées par la protéase à sérine NS3/4A. Les fonctions des protéines sont précisées. La protéine ARFP est issue d'un cadre de lecture chevauchant la séquence de la protéine core, sa fonction est inconnue.

II. Le virus de l'Hépatite C

II.1 Taxonomie

Le virus de l'Hépatite C est classé dans la famille des *Flaviviridae*. Cette famille est divisée en plusieurs genres : le genre flavivirus qui comprend le virus de la fièvre jaune, le virus de la Dengue, le virus du Nil occidental, le genre pestivirus composé du virus de la diarrhée bovine et du virus de la peste porcine, et le genre hépacivirus auquel appartiennent le VHC et le GB virus B (GBV-B). Le VHC est lui-même réparti en 6 grands groupes appelés génotypes (de 1 à 6), qui se distinguent par leurs séquences nucléotidiques. Ces génotypes diffèrent par leur répartition géographique, la progression de la maladie et la réponse à la thérapie. Cependant, au sein de chaque génotype, il existe également de grandes différences d'évolution de la maladie selon les patients, variabilité qui peut être reliée au virus (apparition de mutants d'échappement) autant qu'à l'hôte (intensité et qualité de la réponse immunitaire). Le taux de mutation est fort, 10^{-3} par base par génération, ce qui conduit à l'expansion du virus sous forme de nombreux variants au sein d'un même individu.

II.2 Organisation génomique

Le génome viral est protégé par la capsid, formée de protéine core polymérisée. La capsid est elle-même entourée d'une enveloppe dans laquelle les glycoprotéines E1 et E2 du virus sont ancrées. Les particules virales du VHC ont été très rarement observées en microscopie électronique (Shimizu *et al.* 1996). De symétrie icosaédrique, elles ont un diamètre de 45 à 55 nm.

Le génome du VHC est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 bases. Le génome peut être divisé en trois parties de 5' en 3' : la région 5' non traduite (5'NTR) contenant l'IRES, une phase ouverte de lecture principale codant 10 protéines virales, et la région 3' non traduite (3'NTR) (**Fig. 7**).

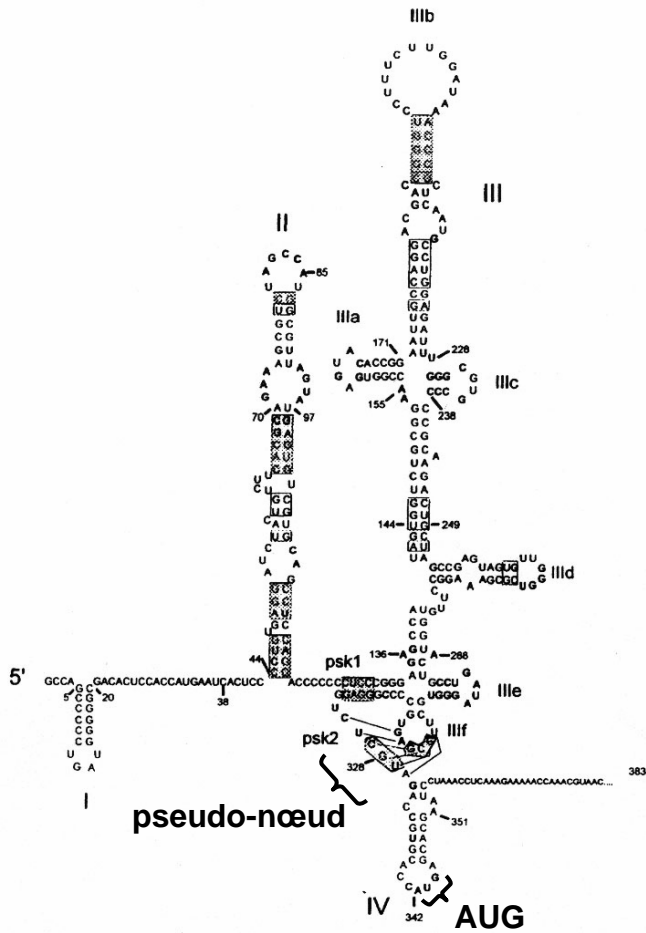


Figure 8. Structure de la région 5' non traduite du VHC (d'après Rijnbrand et Lemon 2000).

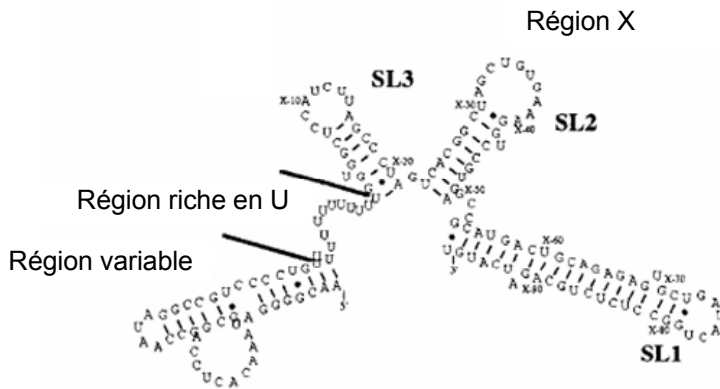


Figure 9. Modèle de structure secondaire de la région 3' non traduite du VHC (selon Ito et Lai 1997).

II.2.1 La région 5' non traduite

Une partie de la région 5' non traduite du VHC forme un site d'entrée interne du ribosome ou IRES, qui dirige la traduction du génome viral. Parmi les *Flaviviridae*, les membres utilisant ce mode de traduction sont les pestivirus, le GBV-B et le VHC. Les mécanismes relatifs à la traduction du VHC seront abordés plus en détail en II.5.3.

L'IRES est hautement structuré et très conservé parmi les différents génotypes. Cette région de 341 nucléotides (nt) se décompose en 4 parties principales, numérotées de I à IV, repliées en tiges-boucles (**Fig. 8**). Les domaines II et III forment deux grandes tiges-boucles. La boucle III_f de l'hélice III est reliée par un pseudo-nœud au domaine IV. Ce dernier est formé d'une tige-boucle contenant le codon d'initiation de la polyprotéine et d'une portion de la phase ouverte de lecture. L'activité de l'IRES est portée par les domaines II, III et IV (du nt 42 à 12-30 nt en aval du codon d'initiation) (Reynolds *et al.* 1995), la délimitation de l'extrémité 3' de l'IRES restant controversée. La première tige-boucle (domaine I) n'est pas nécessaire à l'activité de l'IRES et sa délétion aboutit même à l'augmentation de la traduction (Kamoshita *et al.* 1997). Elle semble être davantage impliquée dans la réplication virale ou porter des fonctions de régulation.

II.2.2 La phase ouverte de lecture

La phase ouverte de lecture commence au nt 342, c'est à dire dans la tige-boucle IV de l'IRES (**Fig. 7**). Elle code une polyprotéine précurseur de 3010 acides aminés qui sera clivée co- et post-traductionnellement pour former 10 protéines virales : les protéines structurales (S) dans la partie N-terminale (1^{er} tiers de la polyprotéine), et les protéines non structurales (NS) dans la partie C-terminale (2 derniers tiers de la polyprotéine). Un autre cadre ouvert de lecture chevauchant celui de la polyprotéine au niveau de la séquence de la protéine core a également été décrit. Ce cadre de lecture, dans la phase -2/+1 par rapport au cadre de lecture de la polyprotéine, dirige la traduction de la protéine ARFP (« alternate reading frame protein ») (Walewski *et al.* 2001).

II.2.3 La région 3' non traduite

La région 3'NTR se divise en trois parties : un premier domaine peu conservé, dont la taille varie en fonction du génotype, une séquence poly(U/UC) de longueur variable, et une séquence très conservée de 98 nucléotides appelée région X et composée de trois tiges-

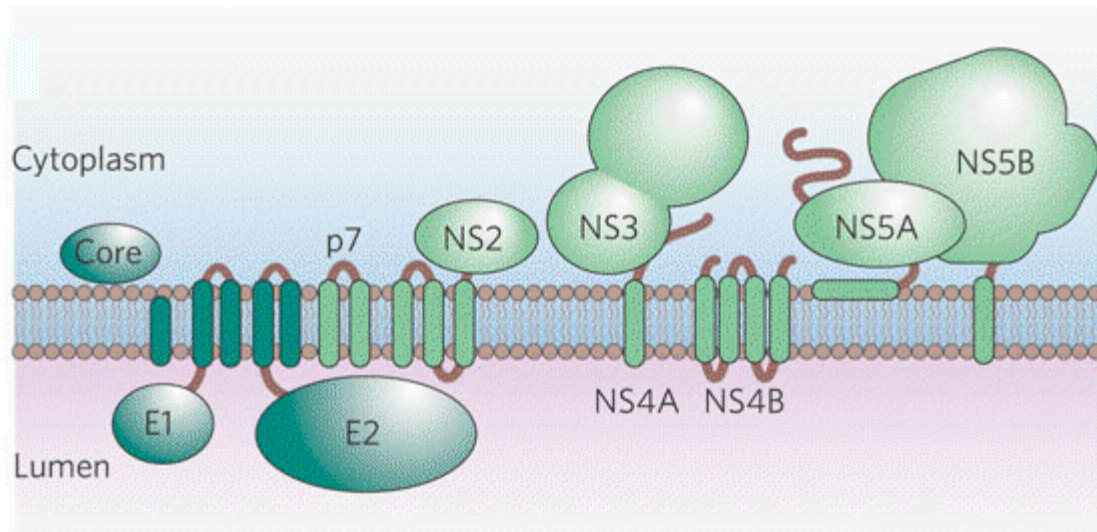


Figure 10. Topologie des protéines du VHC dans la membrane du réticulum endoplasmique.

boucles très stables (**Fig. 9**) (Kolykhalov *et al.* 1996). La région 3'NTR est essentielle à la réplication : sa reconnaissance par l'ARN-polymérase ARN-dépendante NS5B permet l'initiation de la réplication du brin (+) en brin (-) (Kolykhalov *et al.* 2000). La cartographie de cette région a montré que seuls la région X et les 52 nt situés en 3' de la séquence poly(U/UC) contiennent les signaux indispensables à la réplication *in vivo*, le reste du 3'NTR ne jouant qu'un rôle facilitant (Friebe and Bartenschlager 2002; Yi and Lemon 2003). Une séquence nucléotidique présente dans la tige-boucle 2 (SL2) de la région X est notamment essentielle à la réplication (Friebe *et al.* 2005). Le rôle de la région 3'NTR sur la traduction du VHC a fait l'objet de nombreuses études controversées (Ito *et al.* 1998; Ito and Lai 1999; Imbert *et al.* 2003), mais les dernières données semblent indiquer que la présence du 3'NTR augmente la traduction IRES-dépendante en facilitant le recyclage des ribosomes (Bradrick *et al.* 2006; Song *et al.* 2006).

L'interaction de nombreuses protéines avec le 3'NTR a été largement documentée, sans pour autant que leurs rôles respectifs dans la réplication virale soient clairement établis. Les protéines cellulaires comme la polypyrimidine tract-binding protein (PTB), l'autoantigène La et des protéines ribosomales (Tsuchihara *et al.* 1997; Spangberg *et al.* 1999; Wood *et al.* 2001) semblent intervenir pour stabiliser le 3'NTR. Parmi les protéines virales, l'interaction de NS3, NS5A, NS5B avec le 3'NTR ont été démontrées (Banerjee and Dasgupta 2001; Huang *et al.* 2005).

II.3 Structure et fonction des protéines virales

Les protéines du VHC sont classées en deux grands groupes, les protéines structurales (S) et les protéines non structurales (NS), selon qu'elles entrent dans la composition du virion ou qu'elles interviennent dans le cycle viral. En dépit de cette variété de fonction, toutes les protéines sont intimement liées au réticulum endoplasmique (RE) où elles sont localisées. Certaines sont ancrées à la membrane du RE, d'autres seulement apposées à sa surface selon une topologie présentée dans la **figure 10**.

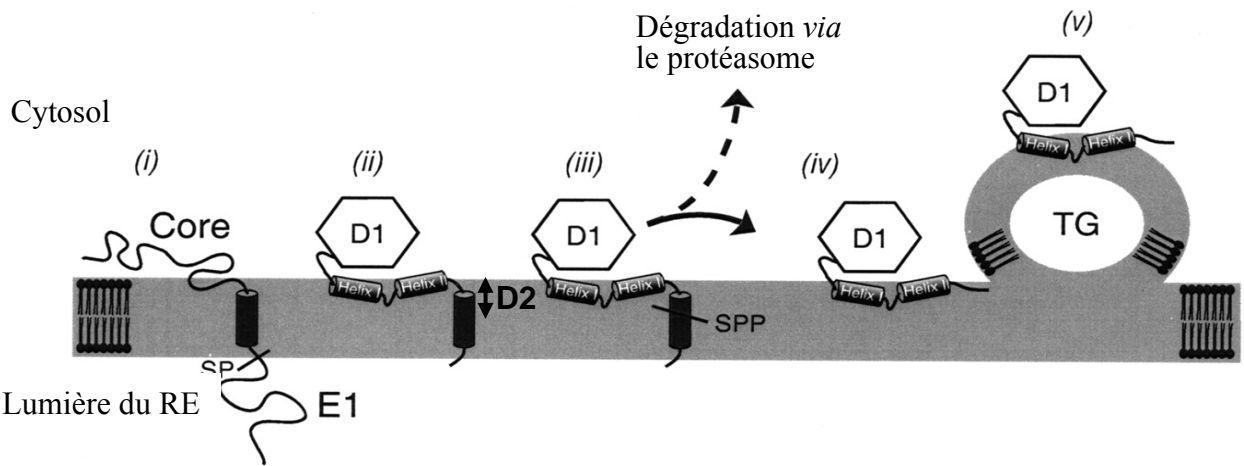


Figure 11. Modèle de la conformation de la protéine core et de sa localisation aux gouttelettes lipidiques (d'après Boulant *et al*, 2006). Après translocation de la polyprotéine à la membrane du réticulum endoplasmique, la signal peptidase (SP) clive la jonction core-E1. La libération de core et l'interaction des domaines D2 avec le RE induit le changement de conformation des hélices I et II et du domaine D1. Le clivage par la signal peptide peptidase (SPP) finalise la maturation de core qui soit reste attachée à la membrane par les hélices de D2, soit est transférée à la surface des gouttelettes lipidiques. Si la maturation n'est pas correcte, la protéine est dégradée par la voie du protéasome.

II.3.1 Les protéines structurales

II.3.1.1 La protéine core

Pendant la maturation de la polyprotéine, un peptide signal localisé entre core et E1 guide ces deux protéines à la membrane du RE. Après translocation de E1 dans le RE, une signal peptidase (SP) cellulaire va cliver la jonction entre ces deux protéines et générer une forme immature de core de 191 aa, qui contient toujours le peptide signal dans sa partie C-terminale. La maturation de la protéine passe par le clivage du peptide signal par une signal-peptide peptidase (SPP) de l'hôte, produisant une protéine de 179 aa (**Fig. 11**) (McLauchlan *et al.* 2002). La localisation de core à la membrane du RE est due à une région hydrophobe s'étendant des aa 128 à 151. Lorsque cette région est délétée core s'accumule dans le noyau, même en présence de la région C-terminale (Okamoto *et al.* 2004). 3 résidus de cette région ont une importance majeure : Leu139, Val140, et Leu144. Leur remplacement inhibe le clivage par la SPP mais pas par la SP et conduit à la localisation nucléaire de core, indiquant leur importance dans la rétention au RE. Cette région semble d'autant plus importante que dans le modèle VHC-LPs (détaillé en II.4.3), le clivage par SPP est absolument nécessaire à la formation de particules (Ait-Goughoulte *et al.* 2006).

D'un point de vue structural, core peut être divisée en deux domaines, D1 comprenant la partie N-terminale jusqu'à l'aa 117, et D2 de l'aa 118 jusqu'à une région comprise entre les aa 171 et 182 qui contient le site de clivage SPP et le début du peptide signal situé à la jonction core-E1. Le domaine D1 a des caractéristiques très similaires aux protéines de capsid des pestivirus et des flavivirus, alors que la région D2 n'est pas retrouvée dans ces virus mais existe chez le GBV-B. D2 est indispensable à la conformation correcte de D1 et confère à la protéine ses propriétés membranaires (Boulant *et al.* 2005). Ce domaine est formé de deux hélices α séparées par une boucle qui nécessitent un environnement hydrophobe pour se conformer correctement. Core est donc une protéine membranaire en absence de détergents et soluble en leur présence. Il a été démontré que le domaine D2 est suffisant pour la localisation de core au niveau des gouttelettes lipidiques et les résidus critiques à cette association ont été identifiés (Boulant *et al.* 2006).

En effet, en plus de sa localisation à la membrane du RE, core peut s'associer par une partie de son domaine D2 aux gouttelettes lipidiques (LD pour « lipid droplets »), où elle colocalise avec l'apolipoprotéine AII, un composant des LD synthétisé dans le foie dont la fonction est inconnue (Barba *et al.* 1997). Les LD sont des organelles conservées dans

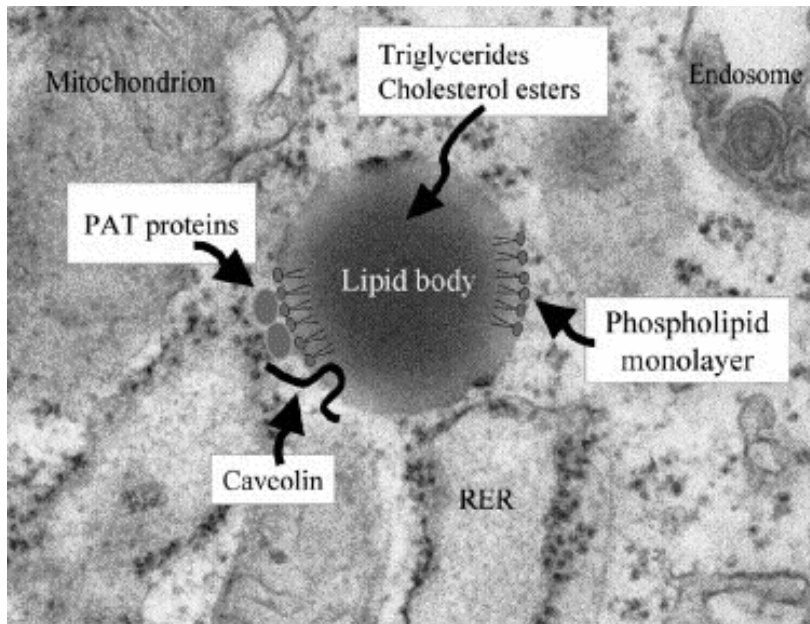


Figure 12. Image d'une gouttelette lipidique en microscopie électronique (d'après Martin et Parton 2005). Cette image a été prise dans un fibroblaste murin primaire et montre la morphologie d'une gouttelette lipidique (lipid body). Cette structure est située très près du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie et d'un endosome tardif, structures avec lesquelles elle est supposée communiquer. La gouttelette lipidique contient des triglycérides et des esters de cholestérol, qui forment le cœur neutre lipidique, entouré d'une monocouche de phospholipides recouverte de protéines de la famille PAT. L'association proposée avec la cavéoline est représentée schématiquement.

l'évolution, de *Saccharomyces cerevisiae* aux mammifères et aux plantes, hautement dynamiques et mobiles, elles interagissent avec de nombreuses autres organelles. Elles permettent le stockage des acides gras et du cholestérol dans le cytoplasme et leur contenu peut être très rapidement déversé dans le cytoplasme. Une nouvelle LD peut ensuite être formée en fonction des besoins de la cellule (Martin and Parton 2005). Une LD est composée d'un cœur de lipides neutres, entouré d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol et de protéines appartenant à la famille des PAT (pour perilipin, adipophilin, et TIP47, les 1^{ères} protéines ayant été classées dans cette famille) (**Fig. 12**) et sa composition est tissu-spécifique. Les conséquences exactes du trafic de core aux LD sont encore mal comprises, mais on peut envisager un rôle au vu des étapes de réplication du VHC fortement dépendantes du métabolisme lipidique (Andre *et al.* 2005) ou dans la pathogénèse (Levrero 2006).

S'il est admis que core est la protéine de capsid du virus, les mécanismes exacts liant cette protéine à l'encapsidation et au relargage de virions néoformés sont encore mal connus et sont résumés en II.5.5. Des études de morphogénèse dans le modèle VHC-LPs ont montré que core permet la formation de la particule (Baumert *et al.* 1998; Baumert *et al.* 1999; Blanchard *et al.* 2002) mais son absence des premiers réplicons subgénomiques fonctionnels indique qu'elle n'est pas essentielle pour la réplication virale. Son action sur la traduction du virus est traitée en II.5.3.2.

Core possède un pouvoir transformant conduisant à la formation de tumeurs quand elle est exprimée dans des souris (Ray *et al.* 1996), mais les mécanismes par lesquels ce potentiel oncogénique aboutit à la transformation des cellules n'est pas encore très clair. Core interagit avec les suppresseurs de tumeur **p53** (Ray *et al.* 1997), **p73** (Alisi *et al.* 2003) et **Rb** (Cho *et al.* 2001). Les conséquences de ces interactions ne sont pas encore bien comprises. La transcription de p53 est activée en présence de quantités faibles de core et inhibée quand core est surexprimée, mais son affinité pour l'ADN est augmentée quelle que soit la quantité de core présente (Kao *et al.* 2004). Core est également responsable de l'inhibition de modifications post-traductionnelles de p53 comme la phosphorylation et l'acétylation. D'autre part, core et p53 interagissent physiquement *in vivo* dans des structures granulaires situées dans la région périnucléaire (Herzer *et al.* 2005). p53 et core interagissent donc à trois niveaux, suggérant un rôle direct du VHC dans la modification de la signalisation p53-dépendante qui peut aboutir à la formation de tumeurs. Il a également été démontré que core module l'expression de la kinase cycline-dépendante **p21/Waf** (Wang *et al.* 2000a), une cible transcriptionnelle de p53 impliquée dans la formation de tumeurs. De nombreuses autres

Lumière
du RE

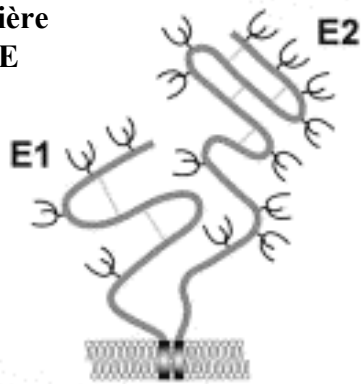


Figure 13. Conformation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 à la membrane du réticulum endoplasmique (d'après Goffard et Dubuisson, 2003.) Les positions des N-glycosylations sont représentées schématiquement.

interactions ont été décrites sans pour autant expliquer le pouvoir oncogénique de core (Levrero 2006). Une étude basée sur l'hypothèse que les tumeurs sont causées par des variants particuliers a montré que les protéines core issues de tissus cancéreux ou sains n'activent pas la même voie de signalisation (Pavio *et al.* 2005). Core isolée à partir de tumeurs inhibe la voie antiproliférative TGF β (tumor growth factor β), en diminuant directement l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription Smad3/4. Il s'agirait d'une stratégie du virus, spécifique aux tissus tumoraux, qui pourrait expliquer la transformation cellulaire par une sélection de clones lors de l'infection chronique, aboutissant à la modulation de voies de signalisation antiprolifératives.

II.3.1.2 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

E1 et E2 sont deux glycoprotéines transmembranaires de type I, comprenant chacune un ectodomaine N-terminal de 160 et 334 aa respectivement, suivi d'un court domaine transmembranaire d'environ 30 aa en C-terminal. E1 et E2 s'assemblent en hétérodimère (**Fig. 13**) (Deleersnyder *et al.* 1997), et cette association est dépendante des domaines transmembranaires (Op De Beeck *et al.* 2001). Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont composés de deux régions hydrophobes séparées par un petit domaine composé de résidus chargés très conservés (Cocquerel *et al.* 2000). La deuxième région hydrophobe de E1 agit comme un peptide signal pour la glycoprotéine E2 (Cocquerel *et al.* 2002). Après clivage par la signal peptidase cellulaire, la conformation des domaines transmembranaires de E1 change, permettant la localisation cytosolique de son extrémité C-terminale. En plus de la formation des hétérodimères, les domaines transmembranaires sont essentiels pour la rétention au RE (Cocquerel *et al.* 1998; Cocquerel *et al.* 2001).

E1 et E2 portent de nombreux résidus N-glycosylés, ce qui leur vaut la dénomination de glycoprotéines d'enveloppe. La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'oligosaccharides sur des résidus asparagine situés dans un contexte précis Asn-X-Ser/Thr. De nombreuses protéines situées à la surface de virus enveloppés présentent cette modification, qui est supposée jouer un rôle dans la stabilité, l'antigénicité ou les propriétés biologiques des protéines d'enveloppe (Kornfeld and Kornfeld 1985). E1 et E2 présentent respectivement jusqu'à 6 et 11 sites de N-glycosylation et ces positions sont très conservées. La N-glycosylation de E1 a lieu post-traductionnellement et augmente quand E1 et E2 sont co-exprimées, indiquant que le clivage, l'assemblage et la glycosylation sont interdépendantes (Dubuisson *et al.* 2000). Le rôle de la N-glycosylation

dans le cycle viral du VHC n'est pas encore clair (Goffard and Dubuisson 2003), mais par analogie avec d'autres virus enveloppés, pourrait intervenir dans la voie de sécrétion en préservant la conformation des glycoprotéines ou dans le masquage des épitopes permettant l'échappement au système immunitaire.

Le modèle VHCpp (détaillé en II.4.5) a montré que E1 et E2 sont essentielles à l'entrée du virus dans la cellule hôte. E1 et E2 se liant au(x) récepteur(s) du VHC permettent la fusion du VHC à la membrane de la cellule cible (Bartosch *et al.* 2003b). Ce rôle dans l'entrée est classiquement attribué à E2, qui interagit avec les candidats récepteurs CD81 et SR-BI (Pileri *et al.* 1998; Scarselli *et al.* 2002). Les expériences de neutralisation réalisées avec des anticorps anti-E2 abolissent l'infection dans le modèle VHCcc (détaillé en II.4.7) (Lindenbach *et al.* 2005). Le rôle de E1 dans l'entrée est peu documenté, mais une étude récente a démontré une neutralisation efficace à la fois des VHCpp et des VHCcc par des anticorps anti-E1 (Dreux *et al.* 2006). Leur implication dans l'assemblage est suggéré, car c'est le cas des glycoprotéines d'autres *Flaviviridae*, comme le virus de la Dengue (Kuhn *et al.* 2002). E1 a récemment été impliquée *in vitro* dans la formation de particules virales par sa liaison avec des oligomères de core (Nakai *et al.* 2006).

Des régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence de E2 (Weiner *et al.* 1991). Ces régions diffèrent jusqu'à 80% d'un génotype à l'autre au sein des sous-types d'un même génotype. Malgré cette diversité, les propriétés physicochimiques des résidus à certaines positions et la structure globale du domaine sont très conservées (Penin *et al.* 2001). La première région hypervariable, HVR1, est constituée des 27 premiers aa de E2, et constitue le seul épitope de neutralisation identifié à ce jour (Farci *et al.* 1996). La variabilité de HVR1 serait liée à la sélection de variants d'échappement au système immunitaire. Ce domaine a probablement un rôle fonctionnel important, car sa délétion atténue l'infectivité du VHC dans le chimpanzé (Forns *et al.* 2000). Par contre, il n'est pas essentiel à la résolution de l'infection ou à la chronicité de la maladie. Une autre région hypervariable, HVR2, s'étend des aa 91 à 97, et présente jusqu'à 100% de diversité. Ces deux régions sont impliquées dans la liaison de E2 à CD81 et à SR-BI (Scarselli *et al.* 2002; Roccasecca *et al.* 2003).

Dans un registre différent, l'addition des protéines structurales dans le modèle réplicon subgénomique (détaillé en II.4.6) a permis de montrer que E2 inhibe la voie de l'apoptose déclenchée par TRAIL (Lee *et al.* 2005). Cette inhibition semble s'opposer au

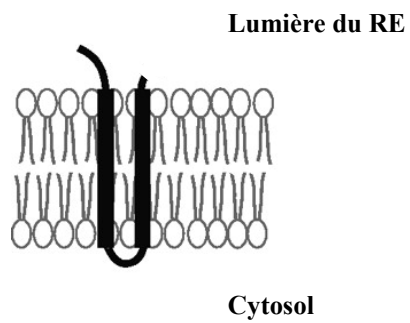


Figure 14. Conformation de p7 dans la membrane du réticulum endoplasmique (d'après Carrère-Kremer *et al*, 2002).

relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Dans ces conditions, E2 pourrait augmenter l'infection persistante en bloquant les mécanismes d'apoptose de l'hôte.

II.3.1.3 La protéine p7

p7 est une petite protéine hydrophobe de 63 aa qui est localisée à la jonction entre les protéines structurales et les NS. Comme sa présence n'était pas requise pour la réplication dans le système réplicon (Lohmann *et al.* 1999; Blight *et al.* 2000) ni pour la formation de particules dans le modèle VHC-LPs (Baumert *et al.* 1998), p7 a longtemps été considérée comme une protéine à part, ni structurale, ni non-structurale. Elle est localisée dans le RE par deux domaines transmembranaires, reliés par une boucle cytoplasmique, alors que ses extrémités N- et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE (**Fig. 14**) (Carrere-Kremer *et al.* 2002) L'extrémité C-terminale de p7 contient une séquence signal qui permettrait son clivage par les signal-peptidases cellulaires et la translocation de NS2 dans la lumière du RE (Mizushima *et al.* 1994), ceci n'a toutefois pas été observé *in vitro* (Yamaga and Ou 2002).

In vitro, p7 fonctionne comme un canal ionique. Ce canal est bloqué par l'amantadine (Griffin *et al.* 2003), une drogue qui agit notamment sur le virus de la grippe, et par des iminosucres modifiés, qui ont une activité antivirale contre le virus de la diarrhée bovine (Pavlovic *et al.* 2003). *In vivo*, p7 est essentielle à l'infectivité chez le chimpanzé et l'utilisation de chimères intragénotypiques a montré que pour que p7 soit fonctionnelle, les extrémités N- et C-terminales, et la boucle cytoplasmique doivent être du même génotype (Sakai *et al.* 2003).

Avec la mise au point du modèle VHCcc, de nouvelles fonctions sont attribuées à p7. Dans ce modèle, le relargage de core dans le surnageant est aboli pour les mutants délétés de p7. Le relargage de core est également fortement réduit par des mutations ponctuelles des acides aminés importants pour sa fonction de canal ionique (Steinmann *et al.* 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, 2006). Avec ces deux types de mutants, ni la réplication, ni l'infectivité des virus produits ne sont affectés mais p7 semble nécessaire au relargage de particules virales infectieuses. Le rôle de p7 dans l'assemblage reste discuté, sa présence n'étant pas requise dans le modèle VHC-LPs (Baumert *et al.* 1998). Il semblerait également que la production de virus, atténuée lors de l'utilisation de mutants de p7, soit partiellement restaurée par apport de p7 en *trans* (Griffin *et al.* 13th International

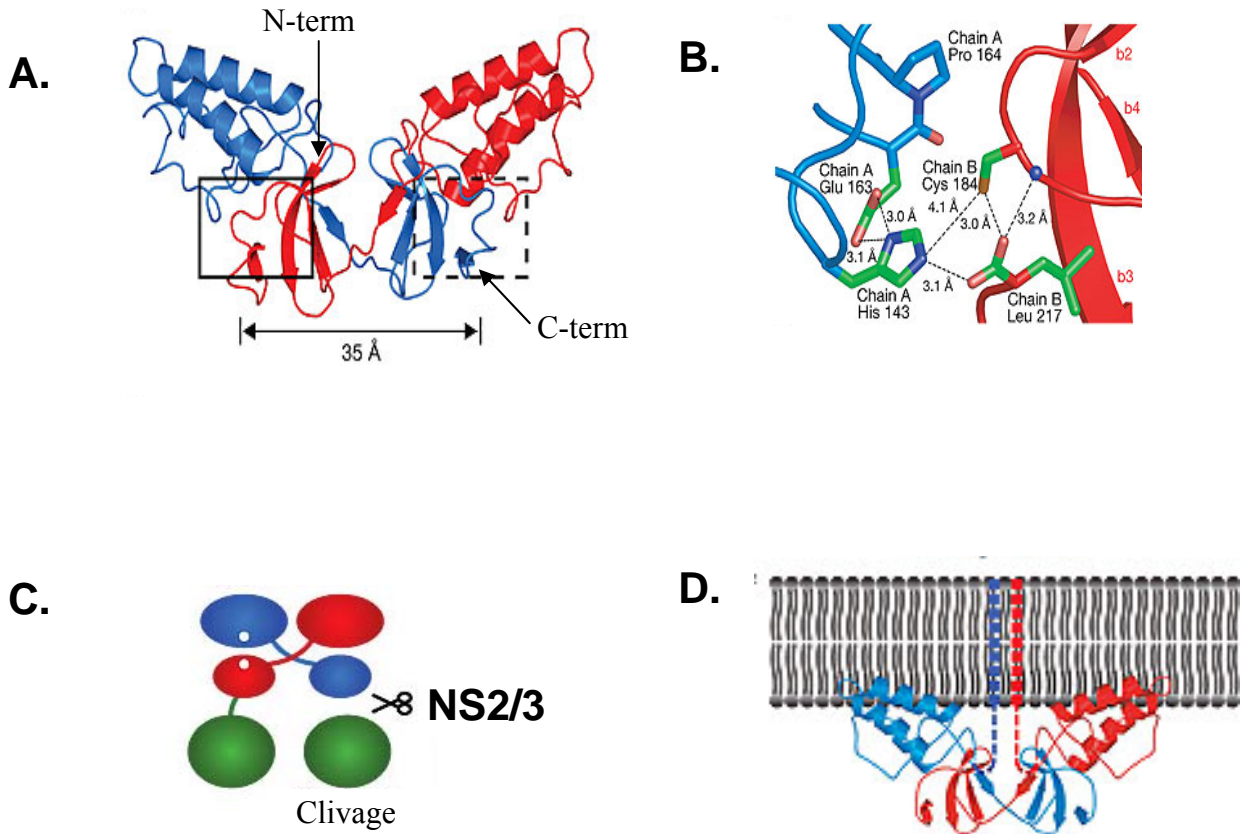


Figure 15. Structure du domaine NS2 après clivage par la protéase NS2/3 (d'après Lorenz *et al*, 2006). (A) NS2 est un dimère: un monomère est représenté en bleu, l'autre en rouge. (B) Site actif de la protéase avant le clivage, qui nécessite le rapprochement des extrémités C-terminales des deux monomères, (C) Modèle d'action de la protéase NS2/3 intégrant cette structure, (D) Modèle de liaison de NS2 à la membrane du réticulum endoplasmique.

Meeting on Hepatitis C and related Viruses, 2006). Ces nouvelles propriétés font de p7 une protéine clé du cycle viral.

II.3.2 Les protéines non structurales

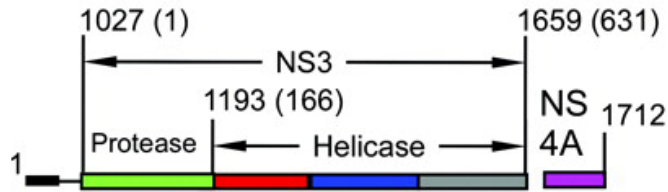
II.3.2.1 La protéine NS2

NS2 est une protéine non glycosylée de 23 kD localisée à la membrane du RE. La nécessité du peptide signal situé à sa jonction avec p7 pour sa localisation reste sujet à controverse, et il semblerait que NS2 s'associe à la membrane au cours de la traduction et sans l'intervention de p7 (Yamaga and Ou 2002). NS2 contient de nombreuses séquences signal permettant son association à la membrane, suggérant la présence de plusieurs domaines transmembranaires. Des études de glycosylation ont montré que ses extrémités N- et C-terminales sont dirigées vers la lumière du RE (**Fig. 15D**).

NS2 ne semble pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral (Lohmann *et al.* 1999; Blight *et al.* 2000), sa fonction principale est le clivage protéolytique à la jonction NS2-NS3. Cette fonction de clivage est portée par une activité protéase à cystéine entre NS2 et la partie N-terminale de NS3 (**Fig. 15C**). Très récemment, la structure de NS2 après clivage par la protéase NS2/3 a été obtenue, et révèle que NS2/3 est un dimère comportant deux sites actifs (Lorenz *et al.* 2006). Pour chaque site actif, les résidus catalytiques histidine et glutamate sont apportés par l'extrémité C-terminale d'un monomère, alors que la cystéine nucléophile est portée par l'extrémité C-terminale du second. Une grande proximité entre les extrémités C-terminales des deux monomères est donc nécessaire pour que la protéase soit active (**Fig. 15B**). Après clivage, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent (**Fig. 15A**), ce qui implique que l'activité protéase est perdue après le clivage de la jonction NS2/NS3 (comparer la distance entre les extrémités C-terminales des deux monomères dans la figure 15B avant et 15A après le clivage).

D'autres rôles ont été suggérés pour NS2, dans l'apoptose (Erdtmann *et al.* 2003) et dans la modulation de gènes de transcription (Dumoulin *et al.* 2003). Elle semble également être impliquée dans la phosphorylation de NS5A (Liu *et al.* 1999). Son interaction avec la caséine kinase CK2 a permis d'émettre l'hypothèse que NS2 est une protéine à demi-vie courte, dont la dégradation par le protéasome est régulée par phosphorylation (Franck *et al.* 2005).

A.



B.

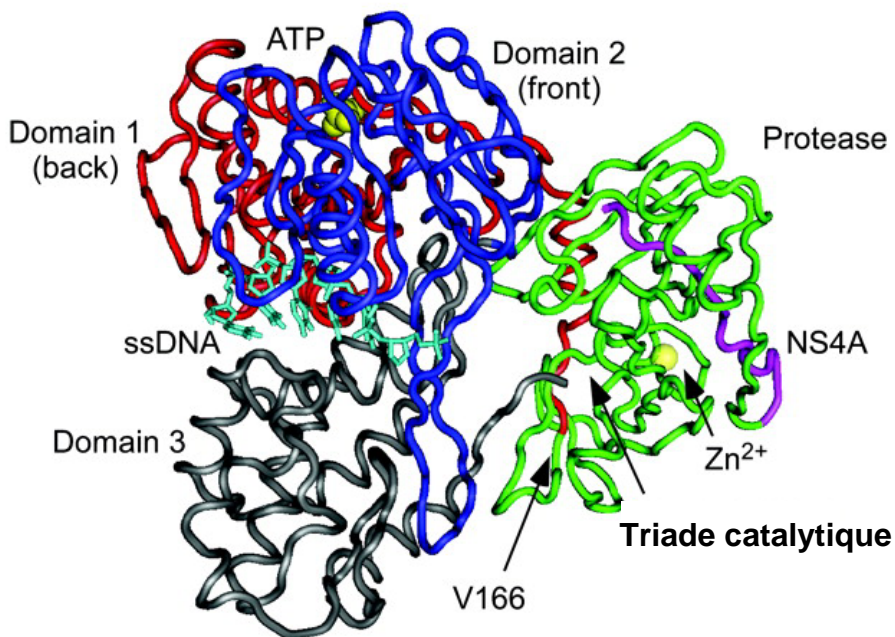


Figure 16. Structure du complexe hélicase-protéase NS3/4A (d'après Frick *et al*, 2004). (A) Cartographie des domaines hélicase et protéase de NS3/4A; (B) Structure issue de la Protein Data Bank obtenue par analyse aux rayons X. La protéase NS3/4A en vert et en violet. La partie hélicase en rouge, bleu foncé et gris commence au résidu 166 (V166). En bleu clair, un substrat de l'hélicase.

II.3.2.2 La protéine NS3

NS3 est une protéine bi-fonctionnelle de 60 kD contenant un domaine protéase et un domaine hélicase (**Fig. 16A**). Les 180 acides aminés de sa partie N-terminale portent une activité de type sérine-protéase. Cette protéase est généralement appelée NS3/4A car son activité est fortement stimulée par la présence de la protéine NS4, *in vitro* et *in vivo*. Le domaine protéase est conformé comme un site actif de type chymotrypsine, avec deux feuillets β à l'interface desquels sont situés les résidus classiques du site actif des protéases à sérine (His, Asp, Ser) (Di Marco *et al.* 2000). NS3 possède également un site de liaison tétraédrique pour un ion zinc, formé par trois résidus cystéine et un résidu histidine, nécessaire à la bonne conformation de NS3 et à la stabilité de sa structure (Kim *et al.* 1996). La poche du site actif de la protéase, particulièrement peu profonde, nécessite des substrats présentant une grande surface d'interaction (**Fig. 16B**). Cette caractéristique complique la mise au point d'inhibiteurs, mais explique pourquoi NS3 possède une telle variété de substrats. En effet, en plus du clivage des jonctions entre les protéines virales de NS3 à NS5B, la protéase clive au moins deux composants cellulaires appartenant à la voie de signalisation de l'ARN double brin : TRIF et Cardif/MAVS (Li *et al.* 2005a; Li *et al.* 2005b). Cette capacité de NS3/4A permet au virus de contourner les défenses antivirales innées de la cellule cible.

Le deuxième domaine fonctionnel de la protéine NS3, formé des 400 derniers acides aminés de sa partie C-terminale, se replie pour former un domaine hélicase de la famille 2DEXH/D-box (**Fig. 16B**). La caractéristique de ce type d'hélicase est de défaire des duplexes ARN-ARN de façon ATP-dépendante (Tai *et al.* 1996). L'hélicase NS3 se lie préférentiellement aux séquences ARN poly(U), avec une spécificité pour la région X du VHC (Banerjee and Dasgupta 2001). Le mécanisme exact de déroulement de l'ARN par NS3 est peu connu, mais même si NS3 peut se fixer à l'ARN avec une grande affinité, il a été démontré que c'est sous forme de dimère et en présence d'ATP que sa fonction hélicase est active (Serebrov and Pyle 2004; Dumont *et al.* 2006).

Plusieurs arguments indiquent que les fonctions protéase et hélicase ne sont pas totalement indépendants : *i*) la structure de NS3 obtenue par rayons X montre à quel point ces domaines sont proches, *ii*) le domaine hélicase isolé a une activité de déroulement de l'ARN inférieure à la protéine complète (Frick *et al.* 2004), et finalement *iii*) la spécificité de l'hélicase pour l'ARN augmente considérablement en présence du co-facteur de la protéase

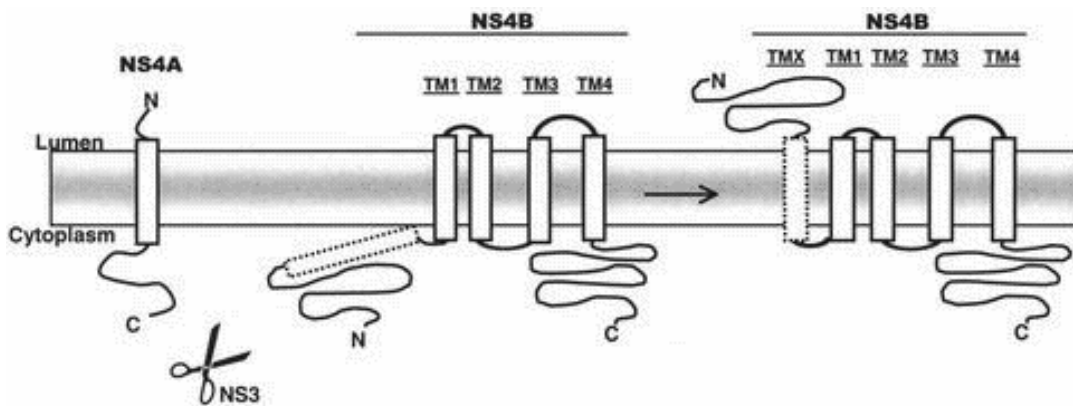


Figure 17. Modèle topologique de NS4B (d'après Lundin *et al*, 2003). La protéase NS3/4A coupe la jonction entre NS4A et NS4B du côté cytoplasmique, libérant NS4B et permettant un réarrangement en créant une 5^{ème} région transmembranaire. Ceci a pour conséquence une orientation de l'extrémité N-terminale de NS4B vers la lumière du réticulum endoplasmique.

NS4A (Pang *et al.* 2002). L'ensemble de ces observations vont dans le sens d'une coopérativité entre les deux fonctions de NS3.

En plus de ces activités enzymatiques, NS3 a été impliquée dans l'oncogénèse liée au VHC. Le domaine sérine protéase seul peut transformer des cellules de mammifères (Sakamuro *et al.* 1995), mais son rôle dans la formation d'un hépatocarcinome n'est pas documenté. Une revue des données actuellement disponibles relie son potentiel oncogénique *i)* à son interaction avec le suppresseur de tumeur p53, qui entraîne une répression du p21^{WAF1}, *ii)* à la modulation de voies de transduction du signal (protéine kinase A, protéine kinase C, facteur de réponse à l'interféron 3...) et *iii)* à sa capacité à se lier aux histones (Levrero 2006).

II.3.2.3 La protéine NS4A

NS4A est un court polypeptide de 54 acides aminés. Son rôle de co-facteur de la protéase NS3 est attribué à plusieurs fonctions. Tout d'abord, il possède un domaine transmembranaire dans sa partie N-terminale qui permet d'ancrer NS3 et donc la protéase NS3/4A au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Wolk *et al.* 2000). D'autre part, NS4A intervient dans le repliement de NS3, et plus spécifiquement dans la conformation correcte de la partie N-terminale, en insérant un de ses feuillets β entre deux feuillets β de NS3. NS4A est également impliquée dans la protection de la protéase contre les dégradations protéolytiques, et finalement permet une activation de l'activité protéase en changeant la conformation du site catalytique.

Il a récemment été montré que NS4A, en plus de sa localisation à la membrane du RE, s'accumule dans les mitochondries où elle cause des dommages aboutissant à l'entrée en apoptose des cellules, et ceci que la protéine soit exprimée seule ou dans le contexte de la réplication du VHC (Nomura-Takigawa *et al.* 2006)

II.3.2.4 La protéine NS4B

NS4B est une protéine très hydrophobe de 27 kDa, comportant quatre domaines transmembranaires s'intégrant co-traductionnellement dans la membrane du RE. Sa partie N-terminale porte un cinquième domaine transmembranaire qui permet l'orientation de cette extrémité dans le lumen après son clivage par la protéase NS3/4A (**Fig. 17**) (Lundin *et al.* 2003).

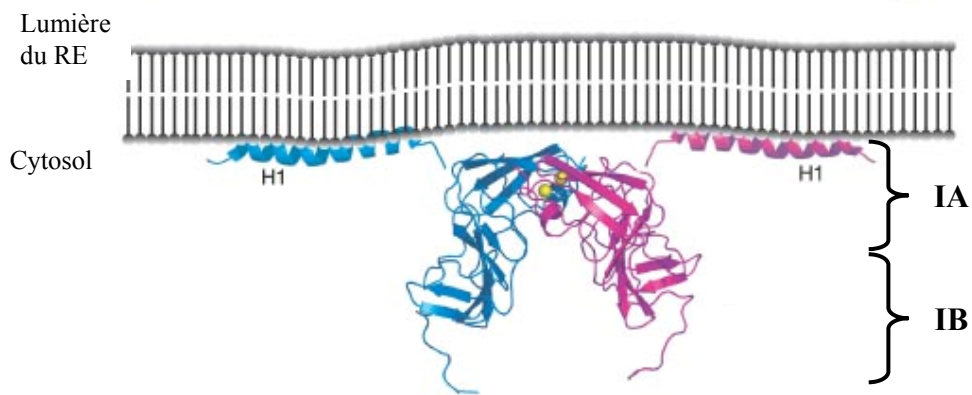


Figure 18. Modèle de la conformation de NS5A à la membrane du réticulum endoplasmique (d'après Tellinguisen *et al*, 2005).

L'insertion membranaire de NS4B aboutit à des altérations des membranes quand cette protéine est surexprimée en culture cellulaire, suggérant qu'elle pourrait intervenir dans la formation du réseau membranaire supportant la réplication. Cependant, la structure vésiculaire créée dans le réseau membranaire lors de la réplication du VHC est absente quand seule NS4B est exprimée, ce qui suggère l'implication d'autres partenaires (Egger *et al.* 2002). NS4B possède une activité GTPase qui pourrait être impliquée dans l'altération des membranes (Einav *et al.* 2004), mais le rôle (positif ou négatif) de cette propriété dans la réplication est controversé. Récemment, il a été montré que l'extrémité C-terminale de NS4B peut être modifiée par des lipides et que cette palmytoylation facilite la polymérisation des protéines NS4B dans le système réplicon, qui pourrait ainsi favoriser la formation du complexe de réplication (Yu *et al.* 2006).

II.3.2.5 La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine de 56-58 kDa associée à la membrane du RE. Son extrémité N-terminale est repliée en une hélice α qui lui permet de s'ancrer à la surface de la membrane et qui, par une surface hydrophobe riche en tryptophane, pourrait servir au recrutement de protéines nécessaires à la réplication (Brass *et al.* 2002; Penin *et al.* 2004). La partie C-terminale est composée de trois domaines séparés I, II et III. Le domaine I, dont la structure a été résolue récemment, permet la fixation de l'ARN (**Fig. 18**) (Tellinghuisen *et al.* 2005). Il est composé de deux sous-domaines : IA contient quatre résidus cystéine qui fixent un ion zinc et dont la mutation abolit la réplication, IB n'est pas essentiel à la réplication et son rôle n'est pas connu. Le domaine I forme des homodimères présentant un sillon dans lequel l'ARN pourrait se positionner. En effet, une spécificité pour les séquences poly(U/UC) a été démontrée pour NS5A produite en bactérie (Huang *et al.* 2005).

Le domaine II est impliqué dans l'inhibition de la protéine kinase PKR, activée par l'IFN en réponse à la présence d'ARN double brin dans la cellule (Gale *et al.* 1998). Finalement, le domaine III est peu conservé entre les génotypes et n'est pas nécessaire à la réplication (Appel *et al.* 2005). Ce domaine a notamment été utilisé pour insérer des gènes rapporteurs de type protéine verte fluorescente (GFP) lors de la construction de réplicons subgénomiques (Moradpour *et al.* 2004b).

NS5A peut être trouvée sous deux formes : hyperphosphorylée (58 kDa) ou non (56 kDa). La fonction de ces différentes formes n'est pas connue. La phosphorylation joue probablement un rôle important, car des mutations réduisant le niveau de

phosphorylation entraînent une augmentation de la réplication. De plus, les réplicons subgénomiques adaptés à la culture cellulaire et ayant des taux de réplication élevés sont plus faiblement phosphorylés au niveau de NS5A (Appel *et al.* 2005). Etant donné que les réplicons adaptés, codant les protéines structurales et non structurales ne produisent pas de virions (Pietschmann *et al.* 2002), une corrélation inverse entre l'efficacité de réplication et production de virions a été proposée. Dans ce cas, la forme la plus physiologique de NS5A serait la forme hyperphosphorylée.

NS5A est connue pour être la protéine de résistance à l'IFN α . Parmi les études disponibles, certaines vont dans ce sens en indiquant que parmi les protéines non structurales du VHC NS5A est l'inhibiteur le plus probable de l'action de l'IFN α dans les cellules hépatiques (Zhang *et al.* 2005) et qu'elle induit une baisse de l'expression des ISG (Geiss *et al.* 2003). D'autres études n'ont par contre pas réussi à mettre en évidence un lien entre NS5A et la résistance à l'IFN (Aus dem Siepen *et al.* 2005). NS5A interagit avec la PKR et induit la sécrétion d'interleukine 8 (IL-8), une cytokine pro-inflammatoire conduisant à une inhibition des effets antiviraux de l'IFN (Gale *et al.* 1998; Polyak *et al.* 2001). L'activation de la sécrétion de l'IL-8 se fait directement au niveau de son promoteur. Le mécanisme par lequel l'IL-8 s'oppose à l'action de l'IFN reste confus mais implique probablement une inhibition de l'expression des ISG.

Au niveau cellulaire, l'interaction de NS5A avec de nombreuses protéines a été démontrée. Ces protéines interviendraient dans l'apoptose, la transduction de signal, l'activation de la transcription et la transformation cellulaire (*ie* SNAP, hVAPA, des composants du complexe TFIID, phosphoinoside 3-kinase, ...) (Levrero 2006). La surexpression de NS5A dans des lignées cellulaires hépatiques aboutit à une instabilité chromosomique et à une aneuploïdie (plusieurs chromosomes en plus ou en moins du complément diploïde naturel), ainsi qu'à des dysfonctionnements mitochondriaux (Baek *et al.* 2006). Le pouvoir transformant de NS5A est également attribué à son interaction avec p53 et TBP (TATA box binding protein), qui empêche la liaison de ces deux protéines à leurs séquences cibles et donc l'activation de la transcription (Qadri *et al.* 2002).

II.3.2.6 La protéine NS5B

NS5B est l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) qui est au centre de la réplication du VHC. Cette enzyme seule peut initier la synthèse d'ARN *de novo*, *in vitro* (Zhong *et al.* 2000).

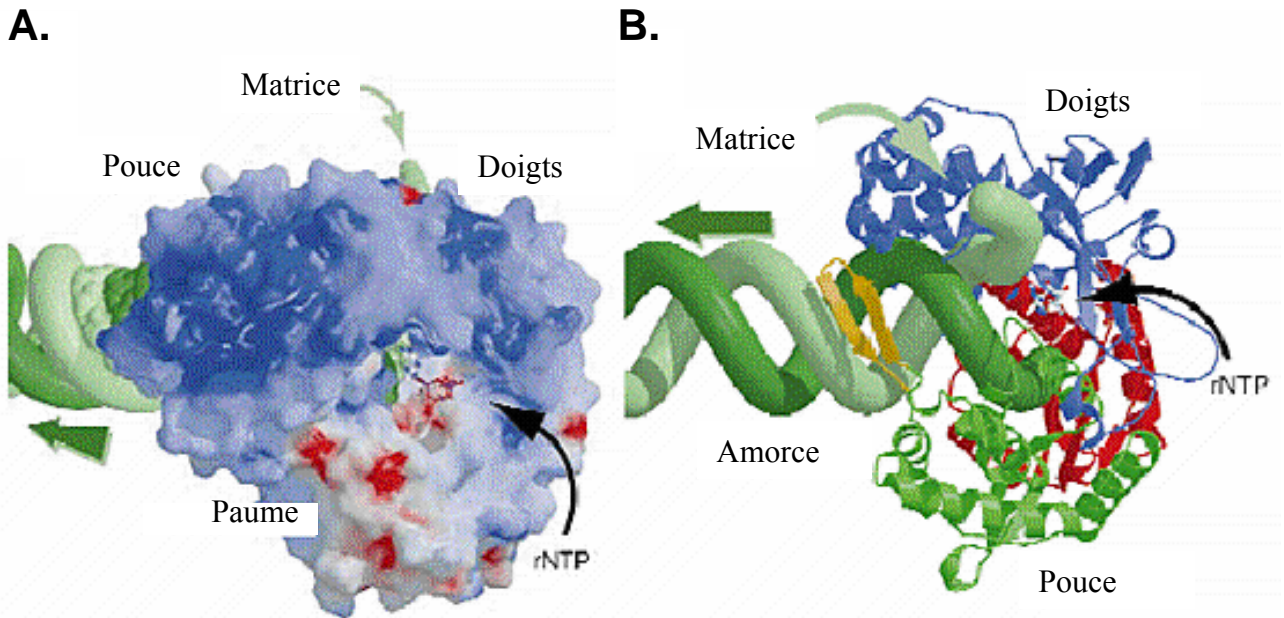


Figure 19. Modèle du complexe NS5B-matrice-rNTP (d'après Lesburg *et al*, 1999). Les sites supposés de liaison des substrats et de l'élongation sont indiqués, la matrice ARN est représentée en vert clair. (A). Voie d'accès des rNTPs au site actif. En bleu et rouge, les potentiels de surface électrostatiques respectivement positifs et négatifs. Le site de liaison des rNTPs et la surface du domaine pouce sont chargés positivement. (B) Représentation simplifiée de la polymérase ouverte montrant la conformation de la matrice virale et de l'amorce ARN.

La structure cristallographique du domaine catalytique de NS5B a été résolue. Cette protéine présente un repliement en « main droite » caractéristique des polymérase, le site catalytique étant situé à la base de la paume, surplombé des domaines pouce et doigts (Lesburg *et al.* 1999). Le site actif de NS5B a la particularité d'être totalement entouré, car les doigts et le pouce interagissent en de multiples endroits et créent un tunnel dans lequel une molécule d'ARN simple brin est guidée. Un autre tunnel, chargé positivement, permet l'entrée des NTPs et leur passage vers le site actif. Le modèle communément admis suggère que la liaison de l'ARN et l'initiation de la réplication sont régulées par une boucle en épingle à cheveux β , située dans le domaine pouce et hautement flexible. Cette boucle pointe en direction du site actif et permet le bon positionnement de la matrice (**Fig. 19**) (Hong *et al.* 2001).

L'association de NS5B à la membrane est nécessaire à la réplication du VHC (Moradpour *et al.* 2004a). Elle est assurée par un peptide d'ancrage situé dans la partie C-terminale. Les protéines NS5B s'associent en oligomère fonctionnel au niveau de la membrane et synthétisent de l'ARN de façon coopérative. Ces interactions RdRp-RdRp pourraient être impliquées dans la régulation de l'activité de la réplicase (Wang *et al.* 2002).

II.4 Modèles d'étude

Jusqu'à l'été 2005, les particules de VHC infectieuses produites en culture cellulaire n'étaient pas disponibles. Toutes les données sur les protéines et le cycle viral ont été obtenues en utilisant des modèles mimant une étape de ce cycle, puis ont été regroupées de manière à esquisser un modèle d'ensemble de l'infection par le VHC *in vivo*. Dans ce paragraphe sont regroupés les différents systèmes qui ont abouti aux connaissances actuelles sur le virus.

II.4.1 Les modèles animaux

II.4.1.1 Le chimpanzé

Seuls l'humain et le chimpanzé peuvent être infectés par le VHC, avec des progressions physiopathologiques comparables (Kolykhalov *et al.* 1997). Le chimpanzé est un bon modèle d'étude de l'élimination du virus, car sa clairance virale est plus importante que celle de l'homme (Bassett *et al.* 1998). Lors de l'infection chronique, des lésions

caractéristiques sont retrouvées dans les foies des chimpanzés, qui peuvent conduire à la formation d'un hépatocarcinome. Pour des raisons de coût, de maintenance et d'éthique (cette espèce est protégée), l'utilisation de ces animaux à des fins de recherche est très limitée, voire interdite dans la plupart des pays.

II.4.1.2 Les autres modèles

Des infections expérimentales par le VHC ont été obtenues chez le tupaïa, un petit rongeur sauvage, génétiquement proche des primates, qui peut s'adapter aux conditions de laboratoire (Xie *et al.* 1998; Zhao *et al.* 2002). Comme il ne s'agit pas d'une souche de laboratoire, la reproductibilité et l'analyse des expériences sont parfois compliquées.

Il a également été possible d'infecter par le VHC des souris SCID-uPA ou des rats greffés avec des hépatocytes humains ou des lignées hépatocytaires (Mercer *et al.* 2001; Wu *et al.* 2005). Ces modèles ne sont pas faciles à mettre en œuvre car la transplantation d'hépatocytes est ardue, surtout chez des nouveau-nés immunodéprimés. De plus, du fait de leur immunodéficience, ils ne sont pas adaptés aux études relatives à la pathogenèse liée au VHC.

II.4.2 Les glycoprotéines solubles

L'étude des glycoprotéines d'enveloppe a été compliquée par leur fort ancrage dans la membrane du RE et les séquences d'hétérodimérisation présentes dans leurs domaines transmembranaires, conduisant à l'agrégation ou la mauvaise conformation de ces protéines (Dubuisson 2000). Des méthodes de purification basées sur l'utilisation de détergents ont toutefois permis de solubiliser ces protéines. Leur expression à la membrane a été difficile à mettre au point à cause de leur rétention au RE. Une solution a été de déléter le domaine transmembranaire, produisant des formes sécrétées sE2, capables de se lier spécifiquement aux cellules (Flint *et al.* 1999). L'utilisation de sE2 a permis l'identification de CD81, de SR-BI et de DC-SIGN par purification d'affinité (voir II.5.1). Les glycoprotéines sE2 ont permis l'étude structurale de E2, et la confirmation de son rôle dans l'attachement.

II.4.3 Les particules virus-like (VHC-LPs)

Les particules virus-like (VHC-LPs) ont été le premier modèle d'étude de l'entrée du VHC dans la cellule cible, basé sur l'expression des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Les VHC-LPs sont produits dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant



Construction de baculovirus recombinants

Infection de cellules d'insecte

Récupération des VHC-LPs dans les cellules d'insecte et purification

Figure 20. Stratégie d'obtention des VHC-LPs.

codant l'ensemble des protéines structurales du VHC (core-E1-E2) et une partie de l'IRES (**Fig. 20**) (Baumert *et al.* 1998). Les protéines produites s'auto-assemblent en particules, mais comme elles ne contiennent pas de génome entier elles ne peuvent pas se répliquer. Les VHC-LPs ne sont pas relarguées dans le surnageant de culture, ce système ne permettant probablement pas la finalisation de l'assemblage ou la sortie des particules. Ces dernières sont purifiées à partir des lysats cellulaires et possèdent une morphologie et des caractéristiques biophysiques similaires aux virions issus de patients infectés (Baumert *et al.* 1999). Il a pu être montré que les glycoprotéines virales sont correctement conformées dans les VHC-LPs (Triyatni *et al.* 2002), et que ces particules peuvent se fixer aux cellules et être neutralisées comme les virions natifs (Steinmann *et al.* 2004). Toutes ces caractéristiques en font un candidat vaccin potentiel (Baumert *et al.* 1999), et elles sont d'ailleurs actuellement utilisées dans un essai clinique de phase II (Tab. 2A). Ces VHC-LPs sont utiles pour étudier l'interaction VHC-cellule hôte. Le groupe dirigé par Thomas Baumert a montré qu'elles se lient et entrent dans les lignées hépatocytaires, dans les hépatocytes primaires de tupaïa et dans les cellules dendritiques (Wellnitz *et al.* 2002; Barth *et al.* 2005). Les VHC-LPs sont un modèle de choix pour les études d'attachement, mais elles ne contiennent pas de gène rapporteur permettant leur utilisation pour mesurer facilement l'entrée du virus.

II.4.4 Les pseudotypes VHC/VSV

Un autre modèle utilisé pour étudier la fixation et l'entrée du virion est le système de pseudotypes du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Ce système est basé sur l'expression de glycoprotéines d'enveloppe du VHC, E1 ou E2, en fusion au domaine transmembranaire de la glycoprotéine G du VSV (Lagging *et al.* 1998). La production de glycoprotéines chimériques permet d'éviter la rétention de E1 et E2 au RE par leurs domaines transmembranaires, et permet leur incorporation dans la capsid du VSV, mais pose la question de la conformation correcte des hétérodimères E1-E2. L'utilisation de souches thermosensibles n'exprimant pas la glycoprotéine d'enveloppe du VSV a permis la mise au point d'un modèle optimisé exprimant E1 et E2 du VHC dans des pseudotypes VSV (Codran *et al.* 2006). Ce modèle a permis de suivre l'entrée des particules VHC/VSV dans les hépatocytes humains et de définir le pH de fusion optimal.

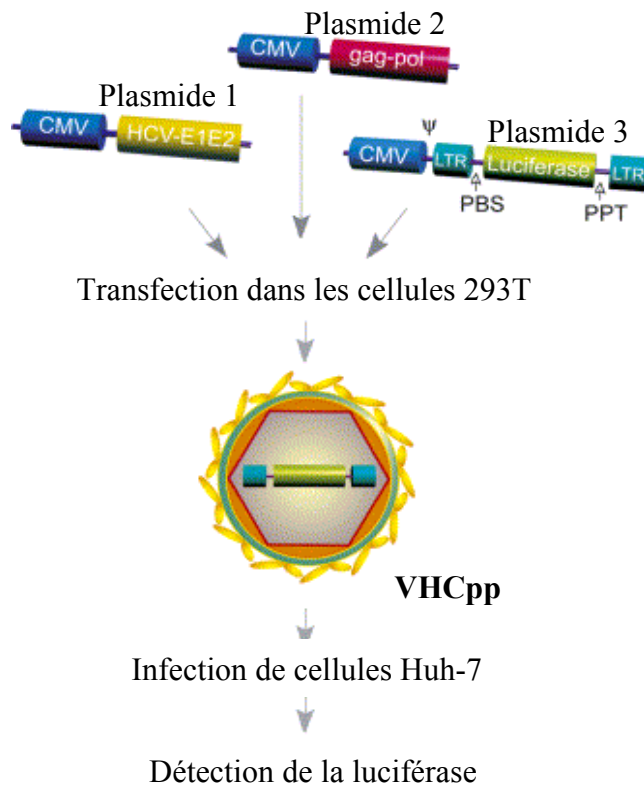


Figure 21. Construction des pseudoparticules VHCpp (d'après Voisset *et al*, 2004). LTR, long terminal repeat; CMV, promoteur précoce du cytomégalovirus; PBS, site de fixation du primer; ψ , séquence d'emballage; PPT, séquence poly-purine; polyA, site de polyadénylation. Le gène rapporteur est la luciférase.

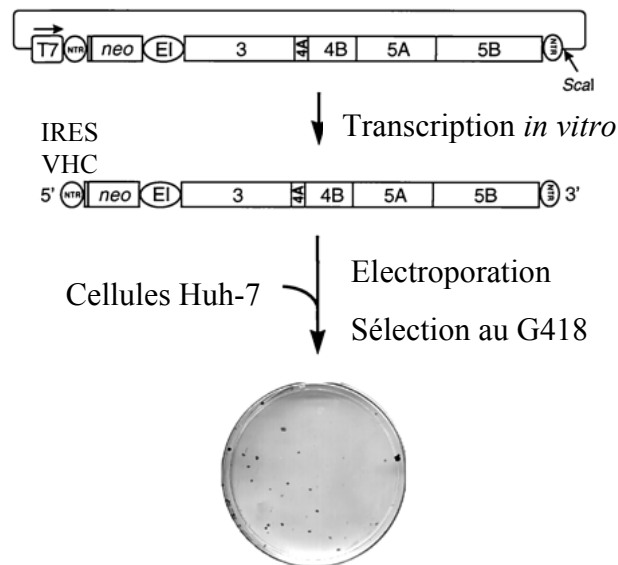


Figure 22. Stratégie expérimentale utilisée pour développer les réplicons subgénomiques (d'après Lohmann *et al*, 2001). *neo*, gène de la néomycine phosphotransférase; EI, IRES de l'EMCV; T7, promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7. 36 nucléotides de la séquence de core sont fusionnés à la partie N-terminale du gène néomycine pour le fonctionnement optimal de l'IRES.

II.4.5 Les pseudoparticules VHCpp

Les particules pseudotypes VHC/VIH ou VHC/MLV (virus de la leucémie murine) appelées VHCpp, sont formées des glycoprotéines d'enveloppe du VHC, E1 et E2, assemblées dans une particule constituée d'une capsidite rétrovirale ou lentivirale. Les VHCpp sont obtenues par co-transfection de trois vecteurs (**Fig. 21**). Le premier exprime E1-E2, le second la protéine de capsidite rétrovirale ou lentivirale (gag-pol). Le troisième plasmide porte le signal d'encapsidation nécessaire à la formation et au relargage des particules en amont d'un gène rapporteur (la protéine verte fluorescente GFP ou la luciférase). La formation de particules aura lieu dans les cellules transfectées par les 3 plasmides à la fois. Les particules formées sont récupérées dans le surnageant et utilisées pour infecter des cellules naïves. Leur pouvoir infectieux est directement testé par l'expression du gène rapporteur (GFP ou luciférase). Dans ce système, l'entrée des VHCpp dans la cellule est médiée par la présence de E1 et E2. La lignée hépatocytaire Huh-7 et des hépatocytes humains ont pu être infectés par les VHCpp (Bartosch *et al.* 2003b; Hsu *et al.* 2003). La production des VHCpp est relativement efficace, de l'ordre de 10^5 unités infectieuses par ml de surnageant. Les VHCpp sont neutralisées par des anticorps anti-E2 et du sérum humain ou de chimpanzé infecté (Bartosch *et al.* 2003a; Logvinoff *et al.* 2004). Elles constituent un bon modèle pour l'étude de l'attachement et de l'entrée du VHC dans les cellules cibles.

II.4.6 Les réplicons subgénomiques

L'absence de particules infectieuses a considérablement limité l'étude de la réplication du VHC jusqu'à la mise au point des réplicons subgénomiques. Le premier réplicon a été construit à partir d'un ARN du génotype 1b, exprimant le gène de résistance à la néomycine à la place des protéines structurales, et les protéines non-structurales sous la direction de l'IRES de l'encéphalomyocardite (EMCV) (**Fig. 22**) (Lohmann *et al.* 1999). Après transfection de cet ARN dans la lignée hépatocytaire Huh-7, seules les colonies possédant la résistance à la néomycine peuvent pousser et sont ainsi sélectionnées et amplifiées. Il est alors possible d'établir des cultures de cellules produisant en continu des réplicons subgénomiques sous pression de sélection antibiotique. Ce système a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de la réplication du VHC. Au cours de la culture, des mutations adaptatives apparaissent dans la séquence du réplicon, souvent dans NS5A, augmentant la réplication d'un facteur allant jusqu'à 10^4 (Blight *et al.* 2000; Lohmann *et al.* 2001). De même, des cellules Huh-7 capables de produire 100 fois plus de réplicons subgénomiques que la lignée

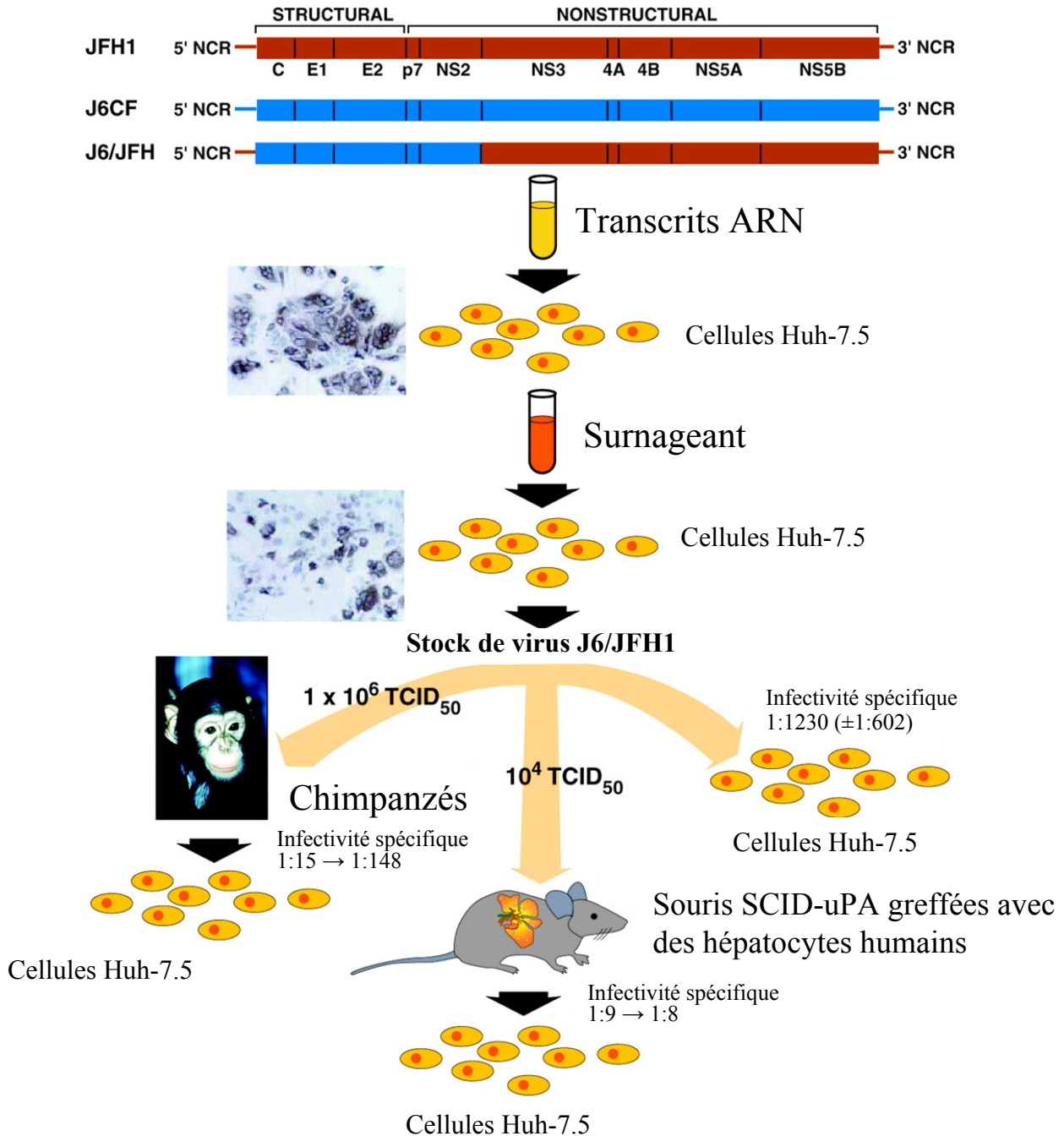


Figure 23. Génération de virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectivité in vivo (d'après Bukh *et al*, 2006).

d'origine ont été sélectionnées au fil des passages (Lohmann *et al.* 2003). Une de ces lignées cellulaires, traitée par l'IFN γ pour éliminer le réplicon, est appelée Huh-7.5. En plus du réplicon issu du génotype 1b, d'autres ont été établis pour différents isolats de génotype 1b, pour les génotypes 1a et 2a, et dans d'autres lignées cellulaires hépatocytaires ou non (Bartenschlager *et al.* 2004).

Finalement, des génomes complets contenant les protéines structurales et les mutations adaptatives ont été construits sous forme de réplicons. Ces réplicons n'ont jamais permis la production de virions infectieux (Pietschmann *et al.* 2002). Ces génomes adaptés à la culture cellulaire se répliquent de façon optimale mais ne permettent pas la sécrétion d'ARN viral ni de protéine core dans le milieu, alors que c'est le cas des génomes non adaptés qui eux se répliquent mal *in vitro*. Les raisons de cette différence ne sont pas connues mais ont permis d'attirer l'attention sur un clone particulier appelé JFH1.

II.4.7 Le système de propagation du VHC en culture cellulaire

II.4.7.1 Le clone JFH1

En 2001, un clone particulier de VHC a été isolé chez un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante C (Kato *et al.* 2001). Ce clone, appelé JFH-1 (pour Japanese Fulminant Hepatitis 1) de génotype 2a a tout d'abord été utilisé pour construire un réplicon subgénomique (Kato *et al.* 2003). Par opposition aux autres réplicons subgénomiques préalablement construits, celui-ci ne nécessite pas de mutations adaptatives pour se répliquer de façon optimale. JFH-1 a ensuite été utilisé pour construire le premier système de culture cellulaire produisant le VHC, le système VHCcc (cc pour culture cellulaire) qui a été décrit presque simultanément par trois équipes (Lindenbach *et al.* 2005; Wakita *et al.* 2005; Zhong *et al.* 2005).

II.4.7.2 Méthodes de culture

Le système VHCcc est basé sur l'électroporation de l'ARN viral du clone JFH-1 dans des lignées cellulaires hépatocytaires Huh-7 ou Huh-7.5. La réplication du virus est vérifiée par la détection des protéines virales par immunofluorescence et par la production d'ARN viral dans le surnageant de culture. Dans un deuxième temps, le surnageant de cette culture contenant les virions néoformés sert à infecter des cellules naïves. Dans la culture, le taux d'infection est faible (quelques pourcents) et la culture reste infectieuse sans pression de

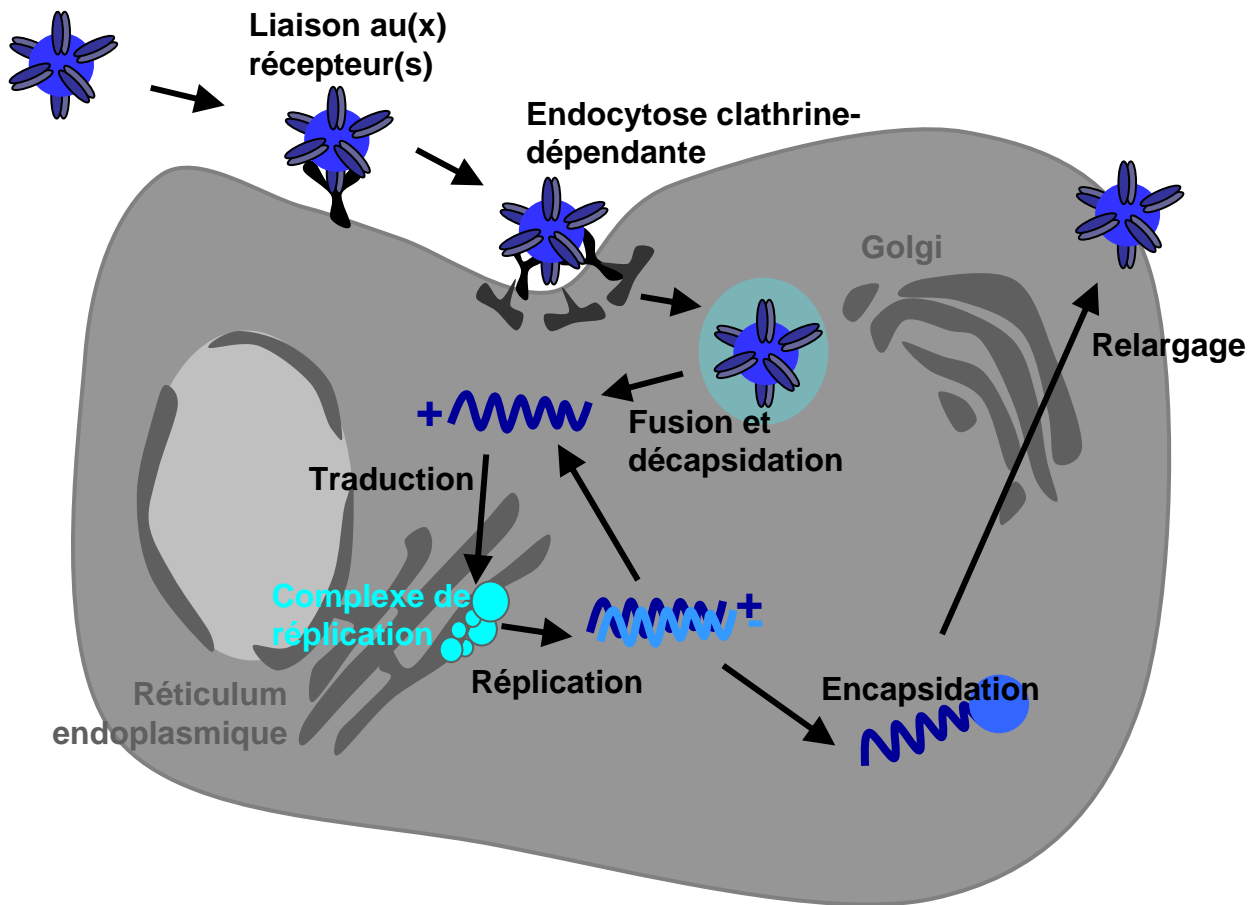


Figure 24. Cycle viral du VHC. Les virions se fixent à la surface de la cellule hôte via un (des) récepteur(s). Les particules sont ensuite internalisées dans une vésicule à clathrine, fusionnent probablement avec un endosome, sont décapsidées et le génome viral est relargué dans le cytoplasme. La traduction du génome permet la synthèse des protéines virales formant le complexe de répliation localisé dans le réseau membranaire dans le réticulum endoplasmique. Après amplification du génome, de nouvelles particules sont formées. Le compartiment dans lequel l'encapsidation a lieu n'est pas connu, mais il semble que des structures membranaires (RE, Golgi ?) soient impliquées. Le mode de sortie des particules néoformées est inconnu.

sélection. Les virions néoformés sont capables d'infecter les cellules voisines dans la culture, ce qui amplifie l'infection. La production de virions est estimée à 10^5 unités infectieuses par ml de surnageant en moyenne. La méthode de production des virions est résumée en **figure 23** (Bukh and Purcell 2006).

Des clones améliorés ont déjà été construits. La chimère actuellement la plus efficace est constituée de la région N-terminale du clone J6 de génotype 2a jusqu'à la fin du premier domaine transmembranaire de NS2, puis des protéines non structurales du clone JFH-1. Cette chimère appelée Jc1 est de 100 à 1000 fois plus infectieuse que le clone JFH-1 d'origine ou que toutes les autres chimères intra- ou inter-génotypiques construites à ce jour (Pietschmann *et al.* 2006). Pour faciliter l'étude de la réplication, une construction bicistronique a été générée, contenant le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de l'IRES du VHC, puis le clone JFH1 exprimé *via* l'IRES de l'EMCV. Par rapport au clone JFH-1, la réplication obtenue à partir de cette construction est plus faible et les titres de virus de 3 à 5 fois plus bas. La détection de l'infection est enzymatique, ce qui permet d'amplifier le signal et fait de ce nouveau clone un outil idéal pour quantifier facilement l'infection VHC (Koutsoudakis *et al.* 2006).

Pour la première fois depuis la découverte du VHC, il est possible d'obtenir des particules virales infectieuses dans un système *in vitro*. Les particules virales vont pouvoir être caractérisées et de nombreuses questions restées ouvertes, notamment sur le cycle viral, vont pouvoir être élucidées : entrée, réplication, relargage des particules... Ce système permettra également de tester facilement et à un coût très réduit de nouvelles molécules antivirales.

II.5 Cycle viral

Le cycle viral est constitué de toutes les étapes depuis l'entrée du virus dans la cellule hôte jusqu'à la sortie de virions néosynthétisés. De 1989, date de la découverte du VHC à 2005 où le premier système de production de particules en système cellulaire a été établi, l'étude des étapes du cycle viral a été réalisée à partir des modèles présentés précédemment. Ces systèmes n'ont pu apporter que des réponses partielles et certaines questions n'ont pas pu être posées. De ce fait, beaucoup de zones d'ombres persistent dans le cycle viral du VHC (Lindenbach and Rice 2005). Le cycle viral actuellement admis est présenté dans la **figure 24**.

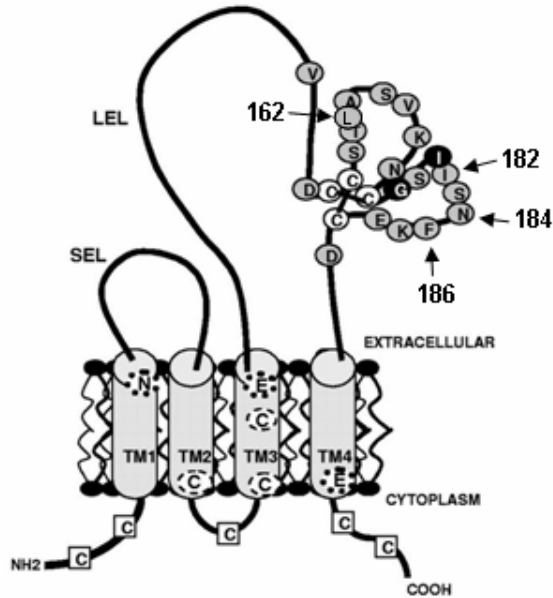


Figure 25. Structure de CD81 (d'après Bertaux et Dragic, 2006). La structure 2D prédite de CD81 est formé de 2 boucles extracellulaires (SEL et LEL), 4 hélices transmembranaires, et du côté intracellulaire une boucle ainsi que les extrémités N- et C-terminales. Les résidus critiques pour l'entrée du virus sont identifiés par des cercles, et les positions des 4 acides aminés les plus conservés sont signalés par des flèches. Les résidus transmembranaires polaires et les cystéines intracellulaires nécessaires à l'entrée du VHC sont représentés respectivement par des cercles blancs et des carrés.

II.5.1 Attachement et entrée de la particule virale

De nombreuses molécules sont impliquées dans la fixation et l'entrée du virus à la cellule. Leur découverte a été rendue possible par l'utilisation des modèles récapitulés en II.4.

II.5.1.1 La tétraspanine CD81

CD81 a été le premier candidat récepteur impliqué dans l'entrée du VHC car il interagit avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Pileri *et al.* 1998). Cette molécule appartient à la famille des tétraspanines, qui contiennent 4 domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires SEL et LEL (small et large extracellular loop) (**Fig. 25**). LEL contient des motifs caractéristiques cystéine-cystéine-glycine importants pour la formation de ponts disulfures (Seigneuret 2006). La liaison de E2 au CD81 se fait au niveau du LEL, sur une surface de 805 Å² et nécessite la présence de 4 résidus conservés (Ile182, Phe186, Asn184, et Leu162) (Drummer *et al.* 2002).

L'implication de CD81 dans l'entrée du VHC a été montrée avec les VHCpp et les VHCcc en utilisant des anticorps anti-CD81 (Bartosch *et al.* 2003b). Cependant, cette neutralisation ne permet pas de bloquer complètement l'entrée du virus. De plus, comme sa localisation ubiquitaire ne permet pas d'expliquer le tropisme restreint du VHC, CD81 est considéré comme un co-récepteur de ce virus. Ceci est confirmé par le fait que CD81 peut fixer E2 même à la surface de cellules non permissives au VHC (Meola *et al.* 2000). Dans les lignées permissives, la fixation de E2 n'est pas corrélée à l'expression de CD81 alors que c'est le cas dans des lignées non permissives, indiquant un site alternatif de fixation de E2 (Bertaux and Dragic 2006). La mutation des acides aminés de la LEL connus pour abolir la liaison E2-CD81 réduit mais n'empêche pas l'infectivité du VHC avec le modèle VHCcc (Flint *et al.* 2006), alors qu'une mutagenèse sur les résidus transmembranaires et intracellulaires de CD81 empêche l'entrée des VHCpp (Bertaux and Dragic 2006). Koutsoudakis *et al.* ont montré par l'utilisation d'anticorps anti-CD81 que ce récepteur interviendrait non pas dans la fixation du virus mais post-attachement, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'un rôle de CD81 plus tardivement dans le mécanisme d'entrée (Koutsoudakis *et al.* 2006).

II.5.1.2 Le récepteur humain de type scavenger de classe B et de type I : SR-BI

Les cellules HepG2 qui n'expriment pas CD81 à leur surface sont néanmoins capables de fixer E2. Cette constatation a abouti à l'identification de SR-BI qui interagit de

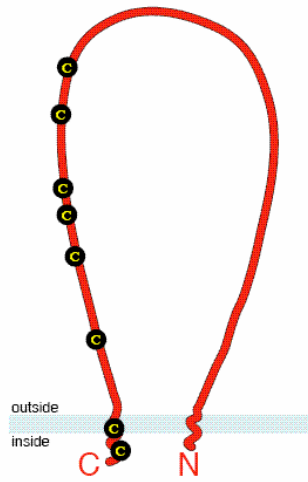


Figure 26. Modèle topologique de SR-BI (d'après Krieger *et al*, 2000). SR-BI est hautement N-glycosylé et palmytoylé sur les cystéines de son extrémité C-terminale et de ses domaines transmembranaires, qui sont indiqués par des cercles.

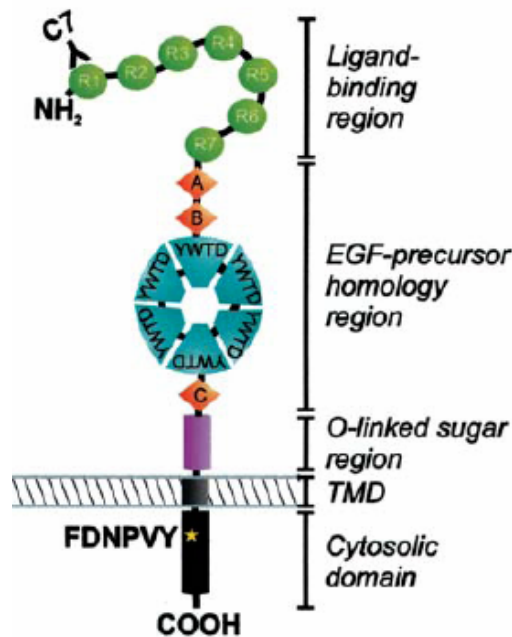


Figure 27. Représentation schématique du récepteur aux LDL (d'après Gent et Braakman 2004).

façon spécifique avec E2 (Scarselli *et al.* 2002). SR-BI est une glycoprotéine exprimée à la surface de la cellule qui contient deux courts domaines cytoplasmiques et deux domaines transmembranaires situés de part et d'autre d'un large domaine extracellulaire (**Fig. 26**) (Krieger 1999). Cette molécule, fortement exprimée dans le foie et dans les tissus stéroïdogènes, lie préférentiellement les lipoprotéines de haut poids moléculaire (HDL, high density lipoprotein) mais aussi de bas poids moléculaire (LDL, low density lipoprotein) oxydées ou non. *Via* cette liaison aux lipoprotéines, elle est impliquée dans le transport spécifique du cholestérol dans la cellule. En effet, SR-BI permet la fixation de HDL avec une forte affinité et ainsi l'entrée du cholestérol qui est présent à leur surface. Les HDL ne pénètrent pas dans la cellule mais sont relarguées dans l'espace extracellulaire. Dans le foie, ce récepteur participe à l'apport de cholestérol aux hépatocytes et également à l'efflux du cholestérol hors de la cellule (Zannis *et al.* 2006).

SR-BI se lie à deux molécules qui influent sur l'infectivité des VHCpp : les HDL qui augmentent l'infectivité (Bartosch *et al.* 2005) et les LDL qui l'inhibent (von Hahn *et al.* 2006), ce qui suggère qu'une interaction avec les lipoprotéines modifie l'étape d'entrée du virus via le SR-BI. Comme HDL et LDL, ses deux ligands naturels, n'aboutissent pas au même effet sur le VHC, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre la relation entre le virus, SR-BI et les lipoprotéines.

Cependant, des lignées cellulaires exprimant à la fois CD81 et SR-BI ne sont pas pour autant permissives au VHCpp (Bartosch *et al.* 2003c). De plus, la distribution de SR-BI n'explique pas la spécificité tissulaire du VHC. D'autres molécules sont donc nécessaires pour l'entrée du virus.

II.5.1.3 Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité rLDL

Dans le sérum des patients infectés, le VHC est souvent associé aux LDL ou aux VLDL (very low density lipoprotein) (Thomssen *et al.* 1992). Le récepteur au LDL (rLDL) a donc été proposé comme candidat récepteur. Si l'internalisation de particules issues de patients est médiée par ce récepteur (Agnello *et al.* 1999), ce résultat n'a pas pu être reproduit en utilisant les VHCpp (Bartosch *et al.* 2003b). Toutefois, un biais lié aux VHCpp n'est pas à exclure et le rôle du rLDL dans l'infection VHC reste encore à définir. Ce récepteur est formé de plusieurs domaines (**Fig. 27**): une région de fixation du ligand, une région homologue au précurseur EGF (epidermal growth factor) nécessaire à la dissociation du ligand dans l'endosome, une région acceptrice de O-glycosylation dont la fonction est

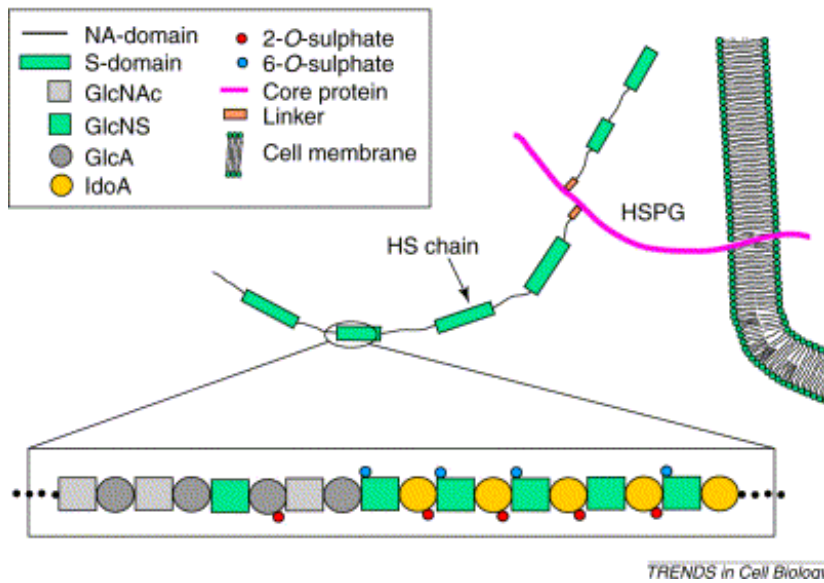


Figure 28. Structure des héparanes sulfates (d'après Turnbull *et al*, 2001).

inconnue, un court domaine transmembranaire et un domaine cytosolique qui régule l'endocytose clathrine-dépendante et le transport des LDL dans la cellule (Gent and Braakman 2004).

II.5.1.4 Les glycosaminoglycanes

La glycoprotéine E2 peut interagir spécifiquement avec des héparanes sulfates (HS) hautement sulfatés exprimés à la surface des cellules (Barth *et al.* 2003). Ces HS forment les protéoglycanes de surface (HSPG) quand ils sont fixés à la membrane via une protéine spécifique. Ce sont des polysaccharides linéaires composé de répétitions de disaccharides qui portent des modifications spécifiques avec notamment l'addition de groupements sulfate (**Fig. 28**). Ils sont liés à la membrane par une protéine transmembranaire (core) pour former les HSPG et cette interaction implique une protéine de liaison. Chaque région variable des HS (domaine S) est composée de diverses séquences de saccharides N- et O-sulfatés à la surface de résidus épimères d'acide d-glucuronique (GlcA) GlcNac (*N*-sulfoglucosamine) ou I-iduronic (IdoA). Les domaines S sont séparés les uns des autres par des régions stables, formées de répétitions d'unités GlcA et GlcNAc (*N*-acetyl glucosamine). Cette famille de molécules a une structure très variable en raison de la nature polymorphique des séquences sulfatées des chaînes saccharidiques (Turnbull *et al.* 2001). Ce sont ces résidus sulfatés qui sont responsables de la fixation primaire de nombreuses protéines et des propriétés régulatrices des HS. Récemment, il a été montré que la nature des HS est importante pour la fixation des VHCpp (Barth *et al.* 2006)

Comme les HSPG sont le site primaire de fixation de nombreux virus (Hacker *et al.* 2005), il a été envisagé que ces héparanes sulfate pourraient constituer le site initial de fixation du VHC. Dans cette hypothèse, le VHC serait dans un deuxième temps transféré à un récepteur secondaire de plus forte affinité qui permettrait son entrée. Une première étude réalisée avec les modèle VHCcc a montré que l'entrée et l'infection de particules étaient inhibées de façon dose-dépendante après traitement à l'héparine, homologue structural des héparanes sulfates ou à l'héparinase, qui clive les héparanes sulfates (Koutsoudakis *et al.* 2006). Les héparanes sulfates sont donc impliquées dans l'attachement du VHC.

II.5.1.5 Les lectines de type C

La protéine E2 surproduite se lie spécifiquement à L-SIGN et DC-SIGN, deux molécules appartenant à la famille des lectines de type C exprimées à la surface des cellules

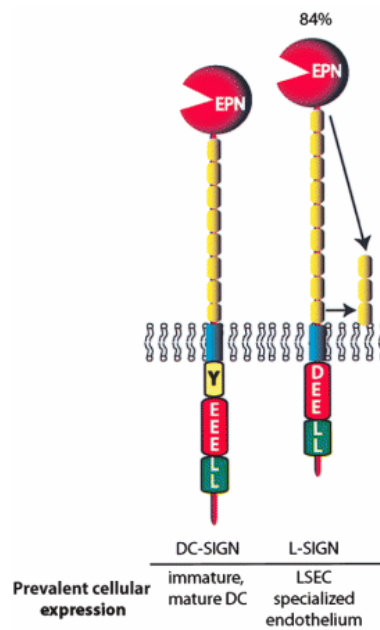
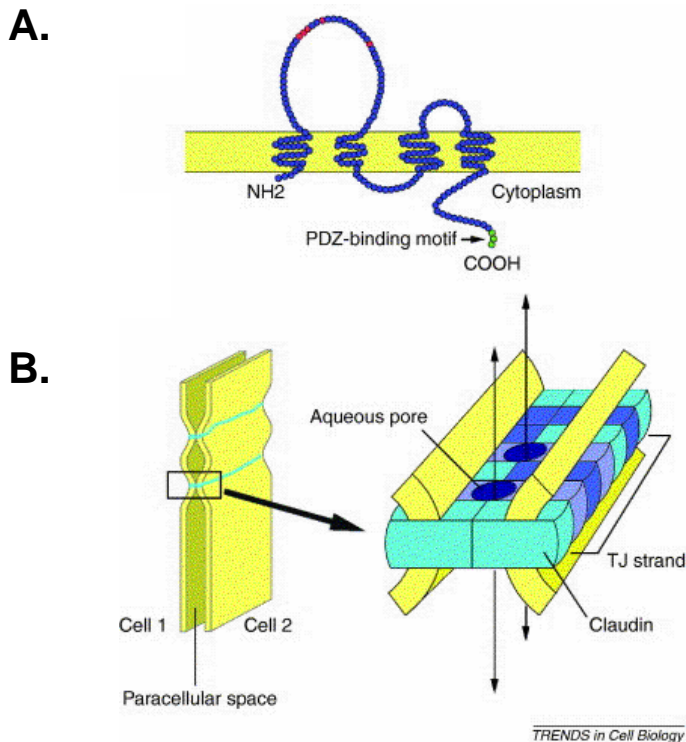


Figure 29. Représentation schématique des récepteurs DC-SIGN et L-SIGN (d'après Koppel *et al*, 2005).



TRENDS in Cell Biology

Figure 30. Structure des récepteurs de la famille des Claudin (d'après Furuse et Tsukita, 2006). **(A)** Structure membranaire du récepteur claudin, qui contient 4 domaines transmembranaires. Le domaine de liaison PDZ localisé à l'extrémité C-terminale est indiqué en vert. **(B)** Modèle d'assemblage d'un récepteur claudin dans les jonctions serrées (TJ strands). Deux cellules vont s'associer latéralement au niveau de leur membrane plasmique pour former une jonction serrée. Des molécules de claudin vont polymériser dans la membrane plasmique de la cellule et s'associer avec les claudin des cellules adjacentes. Ces associations sont supposées former des pores aqueux (schématisés par les flèches)

endothéliales (Lozach *et al.* 2003). Elles sont toutes deux composées d'un domaine extracellulaire comprenant un domaine de reconnaissance du mannose fortement conservé (EPN), des domaines répétés (7 complets et un incomplet pour DC-SIGN, entre 3 et 9 pour L-SIGN). Du côté intracellulaire, DC-SIGN et L-SIGN contiennent une région tri-acide (EEE) et un motif di-leucine (LL) nécessaires à l'internalisation du ligand. DC-SIGN possède en plus un motif tyrosine (**Fig. 29**) (Koppel *et al.* 2005). DC-SIGN et L-SIGN ne sont pas les récepteurs spécifiques du VHC, car ils ne sont pas exprimés à la surface des hépatocytes. DC-SIGN est exprimé sur les cellules dendritiques, alors que L-SIGN est présent sur les cellules endothéliales sinusoidales du foie et dans les nœuds lymphatiques (Koppel *et al.* 2005). Ces deux molécules peuvent capturer et internaliser le modèle VHCpp, ce qui pourrait modifier les fonctions des cellules dendritiques (Lozach *et al.* 2004).

Un autre membre de la famille des lectines de type C, le récepteur des asialoglycoprotéines, est également un candidat récepteur pour le VHC (Saunier *et al.* 2003). Il est exprimé dans le foie, mais son rôle précis dans l'attachement ou l'entrée du virus n'est pas documenté à ce jour.

II.5.1.6 Claudin-1

Tous les candidats présentés précédemment n'expliquent pas le tropisme spécifique du VHC pour les hépatocytes et certaines cellules sanguines. Partant de cette constatation, un clonage d'expression a été réalisé en transduisant une banque rétrovirale d'ADNc dans des cellules non hépatiques (non permissives). Ces cellules sont ensuite mises en présence de VHCpp (Evans *et al.* 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, 2006). A l'issue de ce criblage, une protéine de jonction serrée, fortement exprimée dans le foie, la protéine claudin-1 (CLDN1) a été identifiée. Son expression stable dans des cellules non permissives les rend sensibles à l'infection ce qui est en faveur d'une interaction spécifique entre le virus et la protéine CLDN1. De plus, l'entrée virale peut être inhibée par mutation du récepteur ou l'utilisation d'anticorps dirigés contre une forme étiquetée de CLDN1.

La famille des claudin comporte au moins 23 membres qui sont essentiels à la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales et endothéliales (**Fig. 30**). Les jonctions serrées sont impliquées dans le contrôle du transport paracellulaire et dans la maintenance de la polarité cellulaire. Les différentes protéines de la famille des claudin confèrent différentes perméabilités aux barrières cellulaires (Tsukita and Furuse 2000). Ainsi,

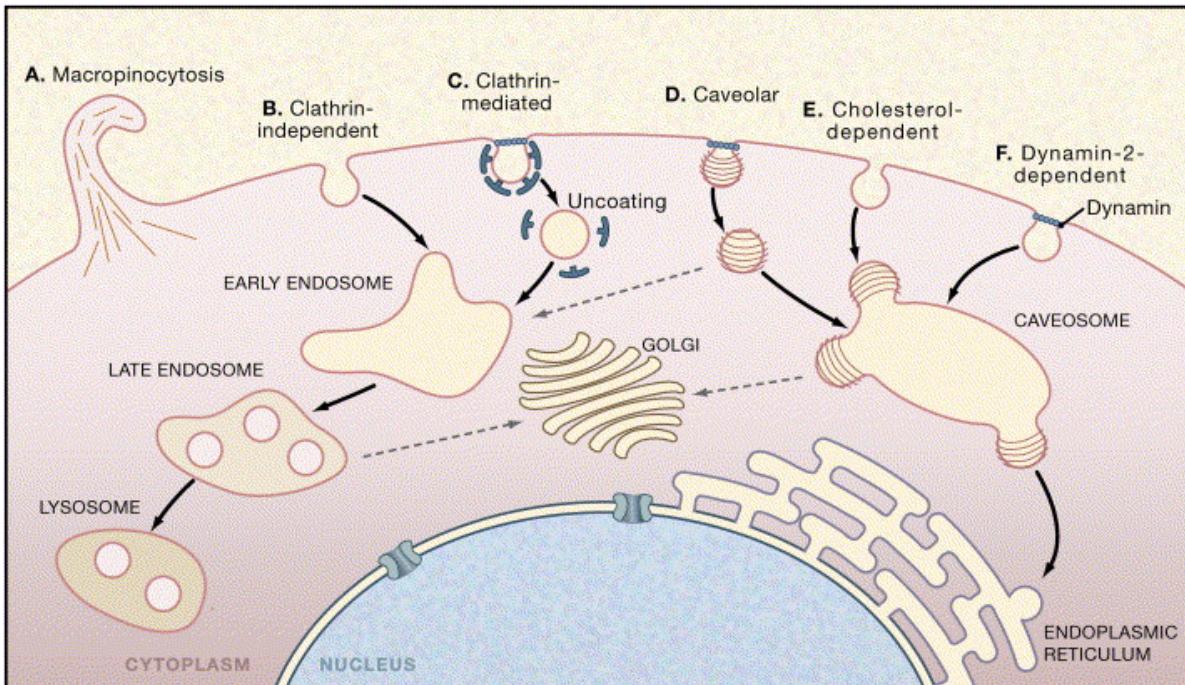


Figure 31. Voies d'endocytose utilisées par les virus (d'après Marsh et Helenius, 2006). (A) Macropinocytose (adénovirus). (B) Voie clathrine indépendante (virus de la grippe, arénavirus). (C) Voie clathrine-dépendante (adénovirus, VHC). (D) Voie de la cavéole, qui conduit les virus dans les cavéosomes puis au réticulum endoplasmique (virus coxsackie B, virus du polyome de la souris). (E) Endocytose cholestérol-dépendante (polyomavirus et SV40). (F) Voie dépendante de la dynamin-2A, similaire à (virus Echo 1) (D). Selon le virus et le type de cellule cible, l'entrée du virus peut se faire à la membrane dans les endosomes précoces ou tardifs, dans les cavéosomes ou dans le réticulum endoplasmique.

dans la plupart des tissus, diverses claudin sont exprimées sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères pour former les jonctions serrées. C'est la composition exacte d'un tissu en claudin qui semble déterminer la sélectivité des pores et la force de ces jonctions.

II.5.2 Internalisation de la particule virale

Peu de données sont disponibles sur les événements suivant la fixation du VHC à son récepteur. L'obtention de particules VHCcc va probablement accélérer la compréhension de cette étape du cycle viral. En attendant, le mécanisme supposé d'entrée du virion dans la cellule est basé sur des comparaisons avec les mécanismes d'endocytose des autres virus (**Fig. 31**) et notamment avec d'autres membres de la famille des *Flaviviridae* qui pénètrent dans la cellule par endocytose (Heinz *et al.* 2004). Chez les flavivirus, les peptides de fusion contenus dans les glycoprotéines d'enveloppe vont permettre la pénétration des virions enveloppés dans la cellule par fusion à la membrane. Les virions vont ensuite fusionner avec un endosome, et c'est le pH acide de l'endosome tardif qui est responsable du changement conformationnel des glycoprotéines d'enveloppe menant à l'exposition des peptides de fusion. Il existe deux types de protéines de fusion I et II, les types II sont retrouvées chez la protéine E des flavivirus et la protéine E1 des alphavirus (Kielian 2006). En l'absence de données structurales, il est possible que d'autres membres de la famille des *Flaviviridae*, incluant le VHC mais aussi des pestivirus, portent des protéines de fusion de type II. En effet, comme les alphavirus et les flavivirus, ces virus ont deux glycoprotéines conformées en hétérodimère, suggérant un même mécanisme de fusion à la membrane.

Des données récentes provenant du système VHCcc confortent ces hypothèses. Elles donnent des pistes quant au mode d'entrée spécifique du VHC. L'utilisation d'inhibiteurs d'ATPases vacuolaires conduit à l'inhibition de l'entrée des particules, indiquant que cette étape est pH-dépendante et nécessite un compartiment intracellulaire acide (Tscherne *et al.* 2006). Au cours de cette étude, les auteurs ont montré que les virions ne sont pas altérés après passage à pH acide et retour à un pH neutre. Pour la plupart des virus enveloppés, un changement conformationnel définitif, nécessaire à la fusion à l'endosome, est induit suite à l'exposition à un pH acide et ces mêmes virus sont inactivés par un pH acide. Ce n'est pas le cas du VHC. En effet, Tscherne *et al.*, ont montré que les VHCcc restent infectieuses après passage à pH5, mais que ce pH n'est pas suffisant pour permettre l'entrée. La fusion nécessite d'autres signaux qui restent à définir, mais qui n'impliquent pas les protéases endosomales préalablement décrites (cathepsines L et B). Ces protéases sont responsables du clivage des

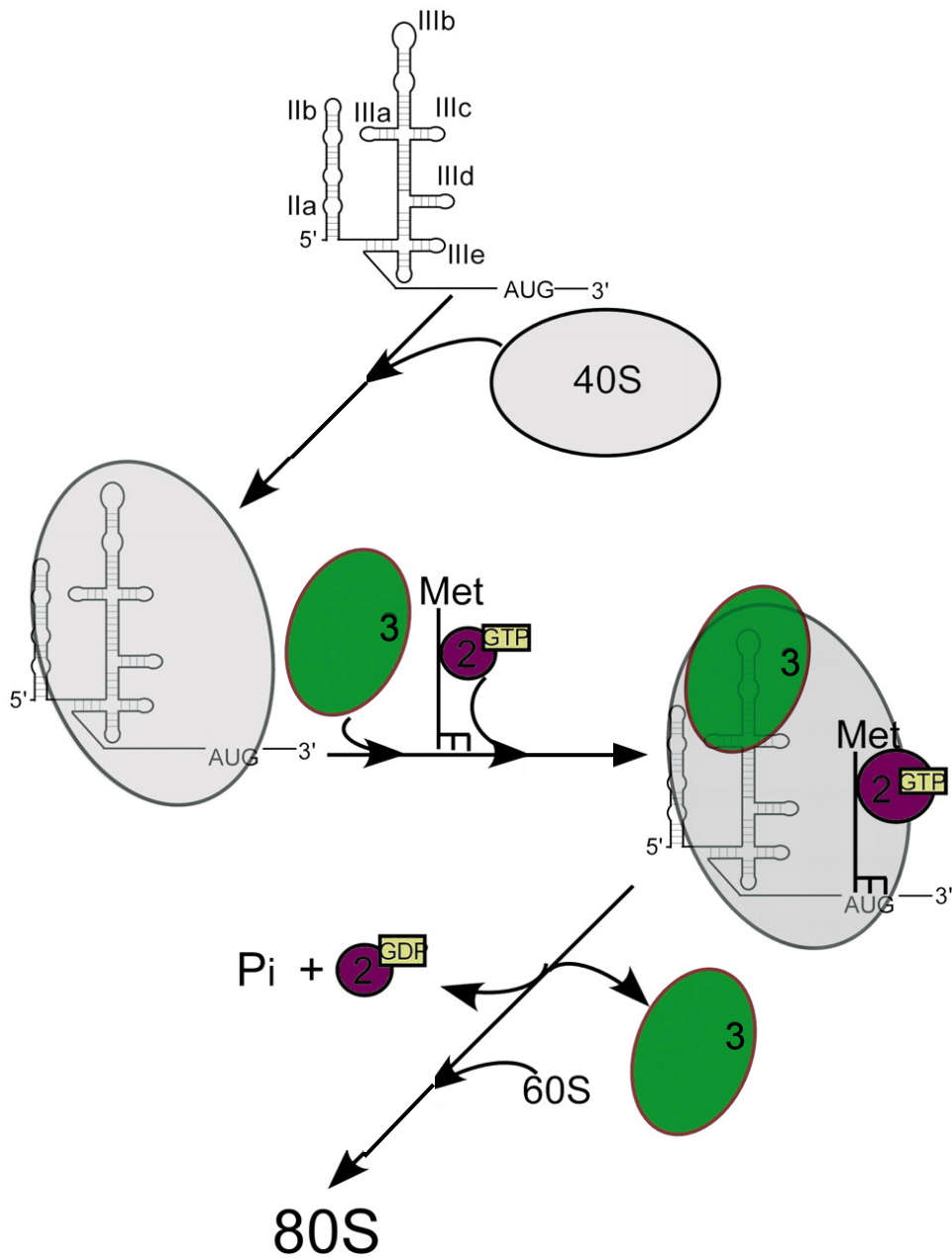


Figure 32. Modèle de l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction dirigé par l'IRES du VHC (d'après Ji *et al.*, 2004). La liaison de la sous-unité 40S à l'IRES nécessite la boucle IIIb. eIF3 interagit avec la région IIIb de l'IRES et permet une association stable de eIF2 pour former le complexe 48S. eIF3 induit le changement de conformation de la sous-unité 40S nécessaire à la fixation de la sous-unité 60S.

protéines virales nécessaire à la fusion d'Ebola, du SARS et des réovirus de mammifères. Dans le cas du virus de la leucose aviaire, les signaux aboutissant à l'entrée sont à la fois l'interaction du virus avec son récepteur et le pH acide (Marsh and Helenius 2006).

D'autre part, l'utilisation de siARN dirigés contre l'ARN messager de la chaîne lourde de la clathrine et de chlorpromazine, un inhibiteur de l'invagination membranaire médiée par la clathrine ont conduit à une inhibition de l'entrée des VHC_{pp} et des VHC_{cc} (Blanchard *et al.* 2006). Ensemble, ces éléments sont en faveur d'un mécanisme d'endocytose médié par la clathrine, suivi par une étape de fusion avec un compartiment endosomal acide <5. Les détails de ces mécanismes, notamment les facteurs additionnels nécessaires à la fusion restent à élucider.

II.5.3 Traduction des protéines virales

Quand le VHC entre dans la cellule, il est décapsidé et l'ARN viral est relargué dans le cytoplasme selon un mécanisme encore inconnu. L'étape suivante est la traduction du génome, nécessaire à la synthèse des protéines virales indispensables à la réplication, et donc à la production de nouveaux virions. La traduction a lieu au RE où sont présentes les signal-peptidases et la signal-peptide peptidase cellulaires, ainsi que les activités protéases des protéines non-structurales, permettant ensemble la maturation complète de la polyprotéine.

II.5.3.1 Traduction de la polyprotéine

La traduction de la phase ouverte de lecture du VHC est dirigée par l'IRES. L'IRES interagit avec des facteurs de la traduction canoniques ou non, permettant le recrutement, le positionnement et la régulation du complexe d'initiation. Les données disponibles sur l'initiation de la traduction du génome viral ont été obtenues *in vitro*, et un modèle de l'assemblage des différents facteurs sur l'IRES est présenté en **figure 32**. La fixation de la sous-unité 40S du ribosome sur le domaine III de l'IRES, sans les facteurs canoniques de pré-initiation, induit un changement de forme de cette sous-unité qui aboutit à la fermeture de la crevasse de fixation de l'ARN_m (Spahn *et al.* 2001). Le complexe IRES-40S va alors recruter le facteur d'initiation eIF3 et le complexe ternaire Met-ARN_t^{Met}·eIF2·GTP pour former un intermédiaire non-canonique 48S, jusqu'à la transition menant à la formation du complexe 80S qui s'accompagne de remaniements de l'IRES (Ji *et al.* 2004; Otto and Puglisi 2004; Boehringer *et al.* 2005). Le facteur d'initiation eIF3, constitué de plusieurs sous-unités et impliqué dans la stabilité et l'assemblage des complexes

ternaires, interagit avec la partie apicale du domaine III (IIIb). Par microscopie électronique, il a été montré qu'un complexe IRES·40S·eIF3 est formé quand eIF3 reconnaît l'IRES du VHC, et que cette reconnaissance se fait par le même domaine qui permet à eIF3 de fixer eIF4F lors de la traduction coiffe-dépendante (Siridechadilok *et al.* 2005).

Un mécanisme alternatif a également été décrit : en présence de concentrations élevées d'ions divalents, de facteurs d'élongation et d'ARNt, la traduction peut être initiée sans aucun facteur d'initiation, par liaison directe des sous-unités 40S et 60S sur l'IRES (Lancaster *et al.* 2006).

Après cette étape d'initiation, la traduction du génome conduit à la synthèse d'une polyprotéine d'environ 3010 acides aminés.

II.5.3.2 Modulation de la traduction par des facteurs viraux

L'activité de l'IRES est modulée par les protéines virales core, NS4A, NS4B et NS5A. Une étude a montré que parmi les protéines virales seules **NS4A**, **NS4B** et **NS5A** inhibent la traduction IRES-dépendante dans des cellules non permissives au VHC (Kato *et al.* 2002; Kalliampakou *et al.* 2005). A l'inverse, l'expression transitoire de NS4B ou NS5A dans des cellules hépatiques a conduit à une augmentation de l'activité de l'IRES (He *et al.* 2003). Cette différence d'effet pourrait être la conséquence d'une action dose-dépendante de ces protéines, avec une action positive ou négative en fonction du rapport entre la quantité exprimée dans la cellule et celle du rapporteur utilisé. D'autre part, l'interprétation des études de la traduction du VHC est souvent compliquée par la grande variété des systèmes utilisés (basés sur des constructions mono- ou bicistroniques) et aux différents gènes rapporteurs utilisés. De ce fait les données disponibles ne sont parfois pas comparables.

Les études sur le rôle de **core** dans la traduction sont également contradictoires. Certaines études montrent que la protéine core inhibe la traduction IRES-dépendante par l'intermédiaire de résidus basiques localisés du côté N-terminal de la protéine (Shimoike *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2002; Li *et al.* 2003). D'autres suggèrent une modulation de la traduction non pas par la protéine mais par sa séquence. La séquence codante de core pourrait agir à distance sur l'IRES par une interaction ARN-ARN (Wang *et al.* 2000b). Cette interaction ferait intervenir les nt 24 et 38 de la région 5'NTR, et les nt 428 à 442 de la séquence de core (Kim *et al.* 2003). Ces données conflictuelles sont à revoir à la lumière d'une étude montrant que la modulation de la traduction serait finalement plus subtile, en fonction de la concentration de core présente. La traduction augmenterait dans un premier temps, pour

diminuer en présence de fortes doses de la protéine (Boni *et al.* 2005). Core se lierait à la fois à l'IRES du VHC et à la sous-unité 40S du ribosome, pour une action ciblée sur l'initiation de la traduction IRES-dépendante. Ces données sont à envisager dans l'hypothèse d'une régulation de la balance traduction/réplication du génome viral, où core servirait de marqueur du niveau de traduction dans la cellule. Quand core est présente en grande quantité dans la cellule, la traduction serait inhibée, ce qui favoriserait la réplication.

L'action de la **région 3'NTR** sur la traduction a fait l'objet de nombreuses études contradictoires (Ito *et al.* 1998; Imbert *et al.* 2003). Le choix et la position des rapporteurs utilisés pour la mesure de la traduction semblent être des paramètres critiques pour tester l'influence du 3'NTR. De même, l'utilisation de l'ARN génomique plutôt que des constructions plasmidiques modifie les données. Des preuves convaincantes très récentes indiquent que la présence de la région 3'NTR augmente la traduction (Bradrick *et al.* 2006; Song *et al.* 2006). Cet effet est uniquement mesuré dans des cellules d'origine hépatique, par transfection de l'ARN de constructions monocistroniques ou de génomes entiers avec des extrémités 3' franches. A l'exception des tiges-boucles 2 et 3 de la région X, la totalité du 3'NTR intervient dans l'augmentation de la traduction, ce qui implique que les régions nécessaires à la réplication et à la régulation de la traduction sont chevauchantes.

II.5.3.3 Modulation de la traduction par des facteurs cellulaires

D'autres protéines peuvent interagir avec la région 5'NTR du génome du VHC. C'est le cas du facteur cellulaire polypyrimidine tract-binding protein (PTB). **PTB** appartient à la famille de protéines de liaison à l'ARN hnRNPI et est localisée aussi bien dans le noyau de la cellule que dans le cytoplasme. Sa fonction principale est de réguler l'épissage des préARNm. PTB interagit séparément avec trois domaines de la région 5'NTR au niveau de motifs proches de la répétition polypyrimidine qui est sa cible (Ali and Siddiqui 1995). Cette liaison à la région 5'NTR est nécessaire à l'initiation de traduction IRES-dépendante *in vitro* (Anwar *et al.* 2000). PTB est également impliqué dans la réplication (voir II.5.4.4).

L'**autoantigène La** est un autre facteur cellulaire modulant la traduction. Son rôle principal dans la cellule est de maintenir l'association de l'ARN polymérase II aux transcrits néosynthétisés. Seuls 20% de La sont présents dans le cytoplasme et cette proportion augmente en présence du VHC (Maraia 2001). La peut interagir avec la région 5'NTR à proximité de l'ATG et cette interaction est importante pour l'initiation de la traduction (Ali *et al.* 2000). En lignée cellulaire, il a été montré qu'en absence de La la liaison

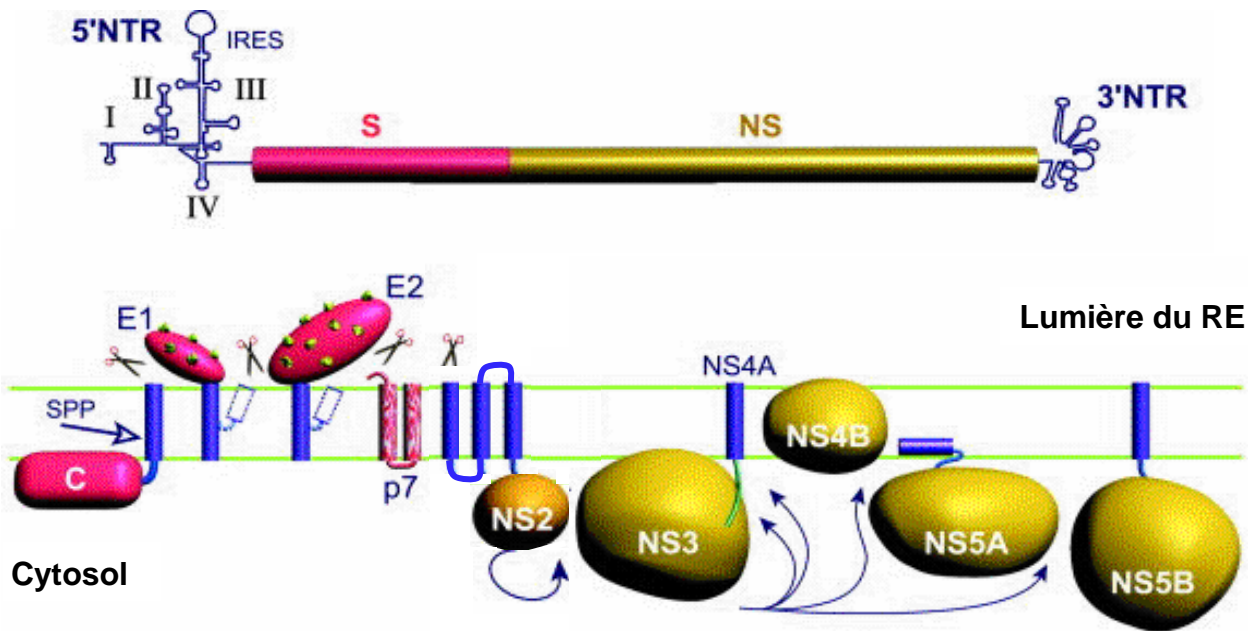


Figure 33. Maturation de la polyprotéine du VHC et localisation des protéines virales au réticulum endoplasmique (d'après Penin *et al*, 2004). La flèche située dans la membrane localise le site de clivage pour la signal peptide peptidase, et la réorientation des extrémités C-terminales hydrophobes de E1 et E2 après maturation est représentée par les rectangles vides. Les ciseaux indiquent les sites de clivage de la signal peptidase, la flèche sous NS2 montre le clivage autocatalytique à la jonction NS2/NS3, les flèches pleines précisent les sites reconnus et clivés par la protéase NS3/4A.

de la sous-unité 40S du ribosome à l'IRES est inhibée (Costa-Mattioli *et al.* 2004). D'autres observations indiquent que la liaison de La près du codon initiateur facilite l'assemblage du ribosome et l'interaction avec les protéines ribosomiques (Pudi *et al.* 2004). La est donc impliquée dans la formation d'un complexe d'initiation fonctionnel et efficace.

Une protéine cellulaire, **NSAP1** (pour NS-1 associated protein 1), augmente la traduction du VHC (Kim *et al.* 2004). Cette protéine présente 82% d'identité avec la protéine hnRNP R (human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R) et a été initialement identifiée pour son interaction avec NS1, une protéine non-structurale majeure du virus minute de la souris (MMV). Elle participe à la stabilisation de l'ARNm de *c-fos* dans la cellule (Grosset *et al.* 2000), et son association avec la synaptotagmine (une protéine membranaire de fonction inconnue) et les séquences poly(A) des ARNs lui ont valu le nom de SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) (Mizutani *et al.* 2000). Le rôle de NSAP1 dans la traduction du VHC est lié à son interaction avec une région riche en adénosines du génome, très conservée parmi les génotypes du VHC et même chez les pestivirus et le GBV-B (Rijnbrand *et al.* 2001). Cette observation suggère un mécanisme de modulation de la traduction par une interaction ARN-protéine en dehors de la région de l'IRES.

D'autres protéines sont décrites pour se fixer à la région 5'NTR comme la protéine **Pcbp2** (poly(C)-binding protein 2) (Spangberg and Schwartz 1999), mais son action sur la traduction n'est pas documentée. Il a été suggéré que les protéines **La**, **PTB**, **Pcbp2**, **unr**, **Mpp-1** et **Nsap1** agissent comme des chaperones en maintenant la structure de l'ARN viral pour faciliter la liaison du ribosome et des facteurs ribosomiques à l'IRES (Jackson 2000).

II.5.3.4 Clivages co- et post-traductionnels

La polyprotéine issue de la traduction du génome du VHC va subir des clivages protéolytiques libérant les protéines structurales, p7 et les protéines non-structurales (**Fig. 33**). Tous ces clivages ont lieu à la membrane du RE, à laquelle toutes les protéines du VHC vont se localiser. Les premiers clivages, aux jonctions core-E1, E1-E2, E2-p7, p7-NS2, sont réalisés par des signal-peptidases cellulaires, libérant des protéines matures. Core est par la suite séparée du peptide signal de E1 par une signal-peptide peptidase. Le clivage de la jonction NS2/NS3 est réalisé par la protéase NS2/3. L'autre protéase codée par le VHC, NS3/4A clive tous les sites situés en amont de NS3 (Lindenbach and Rice 2005).

II.5.4 Réplication de l'ARN viral

Suite à la traduction du génome viral et à la maturation de la polyprotéine résultante, les protéines structurales et non structurales sont libérées et la réplication peut commencer. La réplication du VHC a lieu en association avec les membranes du RE (**Fig. 33**) (Egger *et al.* 2002). L'enzyme centrale portant l'activité catalytique permettant la réplication du virus est NS5B *via* son domaine RdRp. Cette initiation est probablement permise par un complexe multiprotéique appelé réplicase, formé des protéines non structurales, se fixant sur l'ARN pour former le complexe de réplication. L'existence de la réplicase est soutenue par la démonstration de l'interaction entre toutes les protéines non structurales, démontrée *in vitro* et *ex vivo* (Dimitrova *et al.* 2003). Le complexe de réplication se fixe à la membrane du RE au niveau du réseau membranaire (« membranous web »), une structure particulière constituée de vésicules, proche des altérations retrouvées dans les hépatocytes humains infectés par le VHC (Gosert *et al.* 2003). L'utilisation d'un réplicon subgénomique contenant un marqueur vert fluorescent dans le domaine III de NS5A a permis de démontrer par microscopie la colocalisation des NS (réplicase) et de l'ARN viral au niveau du réseau membranaire, suggérant fortement que ces structures sont des complexes de réplication fonctionnels (Moradpour *et al.* 2004b). Cependant, une étude contradictoire réalisée précédemment indiquait que la réplication peut se produire au niveau des radeaux lipidiques, dérivés des membranes intracellulaires (Shi *et al.* 2003).

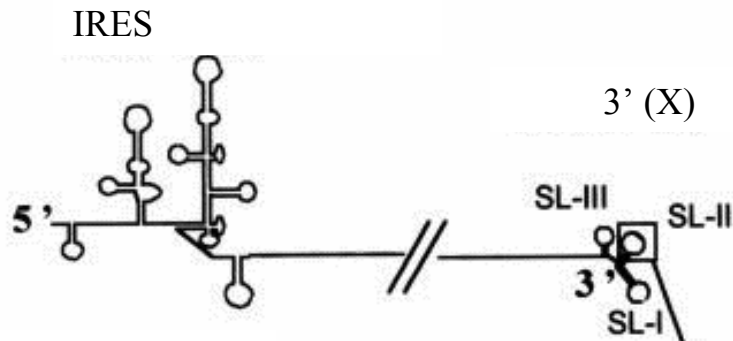
II.5.4.1 Du brin (+) au brin (-), du brin (-) au brin (+)

Les mécanismes exacts de réplication ne sont que partiellement connus. Une étude cinétique réalisée dans le système de réplicon subgénomique a quantifié la réplication : pour un ARN (-), on compte de deux à dix ARN (+) et plusieurs centaines d'exemplaires des protéines non structurales (Quinkert *et al.* 2005)

La réplication de l'ARN (+) nécessite l'assemblage de l'ARN-polymérase ARN-dépendante NS5B, de protéines virales additionnelles (probablement NS3, NS4A et NS5A), ainsi que de facteurs cellulaires au niveau de l'extrémité 3' du génome. Cette synthèse *de novo* va permettre de produire de l'ARN (-).

Le brin (-) néosynthétisé va servir de matrice pour produire de nouveaux brins (+). Ceci est également réalisé par l'activité ARN-polymérase ARN-dépendante de NS5B. Cette synthèse débute par la reconnaissance de l'extrémité 3' du brin (-) par NS5B et probablement d'autres facteurs cellulaires et viraux sous forme d'un complexe contenant au

Brin +



Brin -

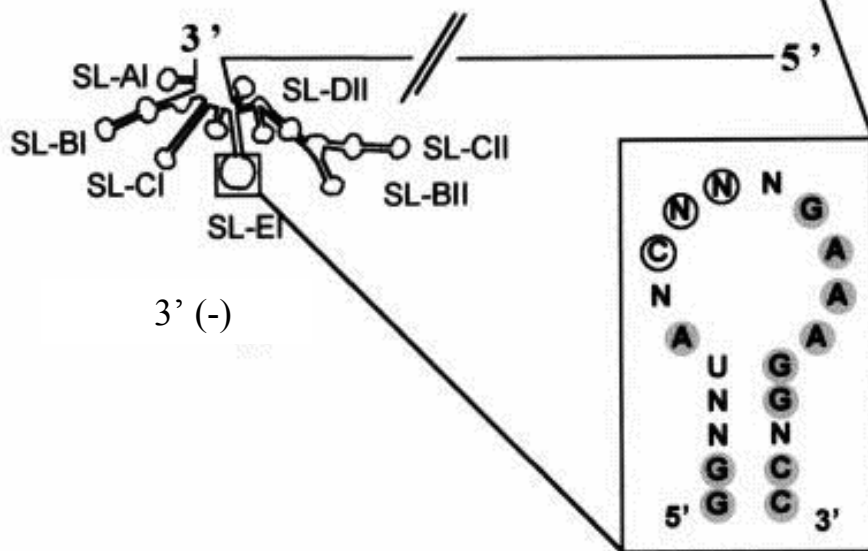


Figure 34. Représentation schématique des brins (+) et (-) du VHC (d'après Schuster *et al.*, 2002). L'agrandissement présente en ombré les nucléotides conservés entre SL-II et SL-EI. Les nucléotides impliqués dans la fixation de PTB sont encerclés.

moins l'hélicase NS3 (Banerjee and Dasgupta 2001). NS5B reconnaît donc à la fois l'extrémité 3' du brin (+) et celle du brin (-), suggérant une conservation de motifs entre ces deux structures nécessaires à la spécificité de la polymérase (**Fig. 34**). L'étude de la structure du 3' (-) a montré sa conformation en 5 tiges-boucles très stables, suivies d'une structure moins stable. Même si le 3' (-) est la séquence antisens de la région 5'NTR, ces structures ne sont pas l'image miroir l'une de l'autre. Les extrémités 3' des brins (+) et (-) sont différentes en structure à l'exception d'une boucle appelée SL-E1 du brin (-) qui présente 60% d'homologie nucléotidique avec SLII du brin (+) (Fig. 34, région encadrée) (Schuster *et al.* 2002). SL-A1 et SL-B1 semblent impliquées dans l'efficacité de réplication *in vitro*, alors qu'elles interviennent peu dans la liaison avec NSB. La délétion de la première aboutit à une diminution de synthèse d'ARN, alors que la mutation de la seconde conduit à une augmentation de réplication (Astier-Gin *et al.* 2005). Plusieurs domaines de la région 3' (-) sont donc impliqués dans la réplication.

Des travaux récents ont permis d'avancer dans la découverte des éléments ARN agissant en *cis* sur la réplication (« *cis*-acting regulatory elements » ou CRE). Il a tout d'abord été démontré que les 125 premiers nucléotides de la région 5'NTR sont nécessaires et suffisants à la réplication, mais qu'elle est maximale en présence de la totalité de la séquence de l'IRES, ou plus exactement de sa séquence complémentaire (Friebe *et al.* 2001). Ceci suggère que la conservation de cette séquence est doublement importante dans le cycle viral, à la fois pour la traduction et par son complémentaire en brin(-) pour la réplication.

D'autre part, **5BSL3.2**, une tige-boucle très conservée située dans NS5B, a été impliquée dans la réplication (You *et al.* 2004). Une étude approfondie a montré que cette tige-boucle s'apparie spécifiquement avec la région 3'X, plus précisément avec la tige-boucle 2 au niveau de nucléotides complémentaires très conservés (Friebe *et al.* 2005). Ces données sont en faveur d'un repliement de type « kissing-loop » entre la séquence de NS5B et la région 3'NTR intervenant au moment de la réplication. Le mode de formation et la fonction exacte de cette structure lors des mécanismes de réplication restent à découvrir, elle pourrait faire intervenir des facteurs de régulation.

II.5.4.2 Membranes cellulaires, métabolisme lipidique et réplication

La réplication du VHC est fortement dépendante du métabolisme lipidique. Les cellules infectées expriment de hauts niveaux d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol. La réplication du VHC est fonction du taux d'expression du géranylgeranyl-

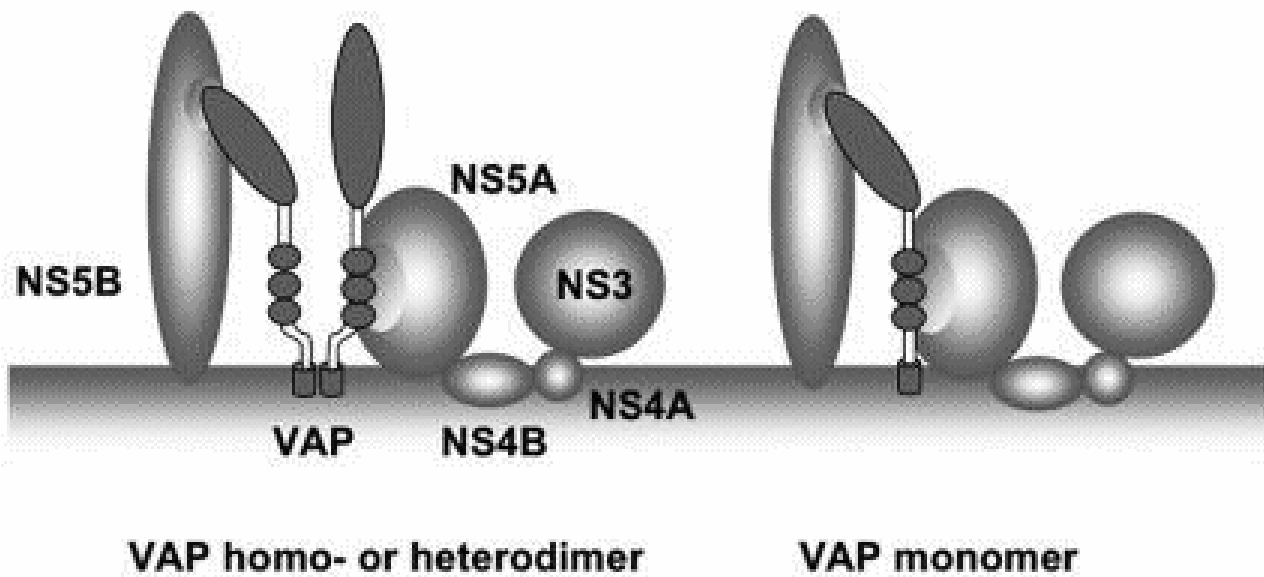


Figure 35. Modèle d'interaction entre les protéines non structurales du VHC et les VAP (d'après Hamamoto *et al*, 2005). Les formes monomériques, hétéro- ou homodimériques peuvent interagir avec NS5A et NS5B. NS4B peut s'associer avec des radeaux lipidiques et interagir avec NS5A. NS4A est le cofacteur de NS3 et recrute cette protéine, formant un complexe.

pyrophosphate dans la cellule, lui-même régulé par la voie de synthèse du cholestérol (Ye *et al.* 2003). La géranylation est directement dépendante du contenu en acides gras (AG) de la cellule. En culture cellulaire, il a été montré que l'efficacité de la réplication varie proportionnellement au degré de saturation des AG et est réduite en présence d'inhibiteurs de la biosynthèse des AG (Kapadia and Chisari 2005). La fluidité de la membrane qui dépend de sa composition en lipides est importante pour la formation du réseau membranaire et par extension pour l'efficacité de la réplication virale.

Comme l'inhibition de la géranylation conduit à la diminution de la réplication, il est envisageable qu'une protéine géranylée soit nécessaire au fonctionnement du complexe de réplication. Dans ce contexte a été identifiée **FBL-2**, une protéine cellulaire géranylée qui interagit avec NS5A et qui est requise pour la réplication du VHC (Wang *et al.* 2005). La fonction de cette protéine dans la cellule est inconnue, mais elle contient un motif F-box qui sert classiquement d'adaptateur pour la présentation de substrats aux ubiquitine-ligases et donc constitue un élément régulateur clé de la stabilité des protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome. Ainsi, FBL-2 pourrait être impliquée dans la dégradation de protéines qui, quand elles sont présentes, inhibent la réplication du VHC

Une autre protéine cellulaire impliquée dans le métabolisme lipidique joue un rôle important dans la réplication virale : la protéine A humaine associée aux vésicules associées aux protéines de membranes (**VAP-A**). Cette protéine, localisée dans le RE et le Golgi est impliquée dans le trafic intracellulaire de vésicules et interagit à la fois avec NS5A et NS5B (Hamamoto *et al.* 2005). Son rôle dans la localisation des NS dans des membranes riches en cholestérol et résistantes aux détergents a été démontré (Horner *et al.* 1992). **VAP-B** est un isoforme de VAP-A et ces deux protéines interagissent entre elles en formant des homo- ou des hétérodimères (**Fig. 35**). VAP-B se lie à NS5A et NS5B, et sa déplétion conduit à une diminution de l'expression de NS5B et non de NS5A, et de la production d'ARN viral (Hamamoto *et al.* 2005).

II.5.4.3 Modulation de la réplication par les protéines virales

Parmi les protéines virales, **NS3**, par son activité hélicase, est indispensable à la réplication du VHC (Kolykhalov *et al.* 2000). Le rôle de l'hélicase dans la réplication n'est pas encore défini mais peut être envisagé au vu des nombreuses et très stables tiges-boucles présentes dans le génome du VHC et notamment à ses extrémités. NS3 pourrait défaire ces structures et déplacer d'éventuelles protéines fixées à l'ARN pour permettre l'initiation de la

réplication. D'autre part, NS3 pourrait être nécessaire pour défaire le complexe de réplication brin (+)/brin (-) et libérer les simples brins néoformés.

II.5.4.4 Modulation de la réplication par des facteurs cellulaires

En plus des CRE et des protéines virales, plusieurs facteurs cellulaires jouent un rôle important dans la réplication du VHC.

Les MicroARNs (miARN) sont de petites molécules d'ARN capables de réguler l'expression des ARNm cellulaires. Une étude systématique a permis d'identifier **miR-122**, un miARN très exprimé dans le foie (Jopling *et al.* 2005). Quand miR-122 est séquestré dans la cellule, la réplication du VHC est diminuée. Le site d'interaction proposé de miR-122 est situé dans la région 5'NTR du VHC. Comme aucune action de ce miARN n'a été retrouvée ni au niveau traductionnel, ni dans la stabilisation de l'ARN, miR-122 agit probablement en facilitant la réplication selon un mécanisme inconnu.

PTB et l'**autoantigène La** qui se fixent au niveau de l'extrémité 3'NTR (Ito *et al.* 1998; Spangberg *et al.* 1999) semblent, en plus de leur rôle dans la traduction, impliqués dans la modulation de la réplication, La en augmentant la réplication et PTB en la réprimant (Domitrovich *et al.* 2005). Une hypothèse est que PTB pourrait bloquer la reconnaissance du 3'NTR par NS5B et/ou NS3, mais les données actuellement disponibles ne permettent pas de conclure avec certitude.

Le criblage systématique de nombreuses molécules pour leur effet potentiel sur la réplication a permis d'identifier la cyclosporine A (CsA). La CsA est un puissant immunosuppresseur capable d'inhiber la réplication du VHC (Watahi *et al.* 2003). Il a été démontré que dans ce cas la cible de CsA est la **cyclophiline B** (CypB), une peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérase. L'interaction de ces 2 molécules empêche l'activation des lymphocytes T (Gothel and Marahiel 1999). La CypB interagit avec la partie C-terminale de NS5B et augmente son affinité pour l'ARN (Watahi *et al.* 2005).

Tout récemment, l'interaction de NS5A avec **FKBP8** a été démontrée. FKBP8 est un membre de la famille des protéines de liaison au FK506 (FKBPs), des peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérases qui sont les protéines cibles de FK506 et de la rapamycine, deux puissants immunosuppresseurs. FK506 est aussi connu sous le nom de tacrolimus et, sous forme d'un complexe avec les FKBPs, se lie à la calcineurine, inhibant l'activité phosphatase de cette molécule et donc l'activation des lymphocytes T (Gothel and Marahiel 1999). FKBP8, dont la fonction est inconnue, est classée dans cette famille par homologie de

séquence mais ne semble pas présenter les propriétés d'inhibition de l'activité phosphatase. Dans le cas du VHC, elle est impliquée dans un complexe contenant NS5A et **Hsp90**, une chaperone moléculaire. FKBP8 et Hsp90 sont chacune indispensables à la réplication dans le système réplicon. Leur inhibition individuelle aboutit à une suppression de la réplication (Okamoto *et al.* 2006). Le(s) mécanisme(s) aboutissant à la formation du complexe et le mode d'action sur la réplication restent à déterminer.

II.5.5 Assemblage et relargage des virions

II.5.5.1 Encapsidation

En l'absence de systèmes cellulaires permettant la production de virions, l'étude de l'encapsidation a longtemps été freinée. Beaucoup d'hypothèses ont été émises par comparaison avec d'autres virus. Les virions des flavivirus par exemple contiennent un génome simple brin de polarité positive entouré par la capsid, elle-même intégrée dans une bi-couche lipidique provenant de l'hôte.

Les virions du VHC sont très probablement composés d'un assemblage icosaédrique de la protéine core formant la capsid, entouré d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Le génome viral est situé à l'intérieur de la capsid. Le système VHC-LPs a permis de déterminer que core et les glycoprotéines d'enveloppe suffisent à la formation de particules dans lesquelles l'ARN viral est sélectivement incorporé (Baumert *et al.* 1998). *In vitro*, les 124 aa de la partie N-terminale de core suffisent à assembler des particules de type nucléocapsid (Kunkel *et al.* 2001). La fixation du génome à la capsid se fait donc probablement dans cette région N-terminale de core. D'autre part, il a été suggéré que la maturation de core est nécessaire à la morphogénèse virale (Majeau *et al.* 2005; Ait-Goughoulte *et al.* 2006). Très récemment, des structures de type capsid ont été formées à partir d'oligomères de la protéine core, capables de lier E1 *in vitro*. L'oligomérisation de core, essentielle à la formation de particules, implique une zone allant des aa 72 à 91 de core et 4 résidus de la boucle cytoplasmique de E1 (312 à 315) (Nakai *et al.* 2006).

II.5.5.2 Sortie des virions

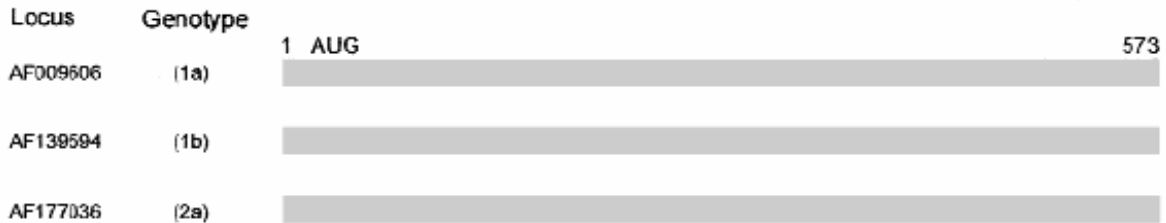
Jusqu'à très récemment aucun modèle d'étude du VHC ne permettait d'étudier la sortie des virions. Avec le système VHCcc, il a été montré qu'à la fois les particules

néoformées présentes dans le cytoplasme de la cellule et les particules circulantes sont infectieuses. La sortie des virions n'est probablement pas liée à une étape de maturation nécessaire à l'infectivité des particules. Cependant, les virions n'ont pas les mêmes propriétés biophysiques selon que leur localisation soit intra- ou extracellulaire (Gastaminza *et al.* 2006). Ceci implique des changements post-assemblage qui peuvent être soit nécessaires à la sortie des particules, soit une conséquence des différents mécanismes aboutissant à cette étape, ou alors le résultat de la liaison des protéines sériques aux particules.

D'autre part, la sortie des virions a été reliée à la présence de la protéine p7. En effet, la présence de p7 est requise pour l'infectivité du VHC chez le chimpanzé (Sakai *et al.* 2003) et dans le modèle VHCcc, l'électroporation du génome JFH-1 délété de la séquence de p7 permet la formation de particules qui sont retenues dans le cytoplasme de la cellule. De plus, ces particules sont moins infectieuses que les naïves, ce qui suggère que p7 est critique pour le relargage des virions mais aussi importante pour leur assemblage (Steinmann *et al.* 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, 2006). p7 pourrait contenir le signal nécessaire au relargage du VHC hors de la cellule. Il reste à déterminer si cette étape implique une lyse cellulaire ou un bourgeonnement à la membrane de la cellule.

B. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

A. Cadre de lecture classique : core



B. Cadre de lecture +1 : protéine ARFP



C. Cadre de lecture +2 : nombreux codons stop

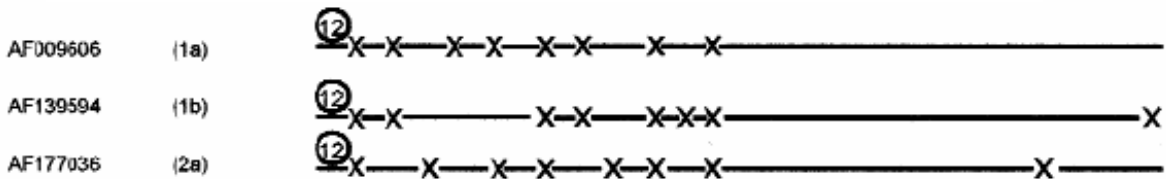


Figure 36. Cadres ouverts de lecture présents dans la séquence du VHC (d'après Walewski *et al*, 2001). (A) Cadre de lecture de la polyprotéine, (B) cadre ouvert de lecture de la protéine ARFP en phase +1, de longueur variable selon les génotypes, (C) présence de nombreux codons stop dans la phase de lecture +2. Les croix figurent les codons stop.

En 2001, en plus des 10 protéines classiquement décrites, l'existence d'une protéine additionnelle codée par le génome du VHC a été démontrée (Walewski *et al.* 2001). Cette protéine, appelée initialement F pour « frameshifting » ou ARFP pour « another reading frame protein », est codée par une séquence codante chevauchant celle de la protéine core (**Fig. 36**). Cette séquence ARF, pour « another reading frame », ne possède pas de codon d'initiation dans sa partie N-terminale.

De tels cadres de lecture existent dans tous les génotypes du VHC avec des longueurs variables résumées dans le **tableau 3**. En absence de codon d'initiation dans sa partie N-terminale, le premier mécanisme proposé pour permettre la traduction de cette séquence chevauchante a été un glissement de cadre de lecture -2/+1 au niveau des codons 10-11 de core, dans une région riche en adénines (Xu *et al.* 2001). Dans le clone VHC-H77 de génotype 1a dont nous disposons au laboratoire, cette séquence chevauchante code une protéine de 161 aa dans le cas d'un glissement de cadre de lecture +1.

Cette protéine reste très énigmatique, autant dans son mode de synthèse que dans sa fonction dans l'infection VHC. Nous avons décidé de nous intéresser à cette protéine suivant deux axes.

La plus grande partie de mon travail a été consacrée à **l'étude de l'initiation de la traduction de la protéine ARFP**. Jusqu'à quatre mécanismes différents ont été proposés pour expliquer la traduction de la séquence ARF : deux types de décalages de cadres de lecture, -2/+1 (Xu *et al.* 2001) ou +1 suivi de -1 (Boulant *et al.* 2003), observés dans deux génotypes distincts, et deux mécanismes d'initiation interne de la traduction au niveau des codons 26 (Baril and Brakier-Gingras 2005) et 86/88 (Vassilaki and Mavromara 2003) de la séquence chevauchante. Chacun de ces mécanismes aboutit à la synthèse d'une protéine de taille différente. A partir de ces données bibliographiques, nous nous sommes intéressés à définir quelle forme de la protéine ARFP était réellement synthétisée dans la cellule hépatique. Pour cela, nous avons déterminé la part des différents sites d'initiation proposés dans la traduction de la protéine ARFP *ex vivo*, dans la cellule. Nous avons construit un système contenant diverses longueurs de la séquence d'intérêt en fusion au gène rapporteur luciférase. Ce système nous a permis de mesurer et de comparer aisément les taux de synthèse obtenus dans les différents contextes étudiés, chacun rendant compte de la traduction à partir d'un ou plusieurs sites d'initiation. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence du contexte viral sur la traduction d'ARFP en nous intéressant à l'impact des extrémités 5' et 3' non traduites du génome, mais également à l'effet de la présence des protéines structurales ou

Genotypes	126 aa^c	131 aa^c	140 aa^c	144 aa^c	155 aa^c	162 aa^c	Others^d
1a [16]						100% [16]	
1b [102]	1% [1]		3% [3]	80% [82]		7% [7]	9% [9]
2a [24]	80% [19]		4% [1]	8% [2]			8% [2]
2b [7]					71% [5]	29% [2]	
3a [11]				36% [4]	46% [5]	18% [2]	
3b [12]	42% [5]		50% [6]				8% [1]
4 [24]	58% [14]	13% [3]			8% [2]	17% [4]	4% [1]
5 [2]	50% [1]					50% [1]	
6 [10]	30% [3]	30% [3]					40% [4]

Tableau 3. Longueur de la séquence codante chevauchante dans les différents génotypes du VHC (d'après Xu *et al*, 2001). 235 séquences codantes de Core présentes dans la base de données <http://s2as02.genes.nig.ac.jp> ont été analysées. Toutes les séquences contiennent des séquences chevauchantes de taille variable, dans une proportion indiquée en pourcentage et en nombre entre crochets. Le codon d'initiation considéré pour la traduction de la séquence chevauchante est le codon 1 de Core, et la longueur totale est calculée selon un glissement de cadre de lecture -2 au niveau des codons 11-12. La dernière colonne tient compte de codons stop retrouvés à des positions non conservées.

non structurales du VHC, et finalement de la protéine core en particulier. Ces expériences ont été réalisées *in vitro* et dans diverses lignées cellulaires nous permettant de nous placer aussi près que possible du contexte de l'infection.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a été consacrée à **l'étude de la fonction de la protéine ARFP**. Nous avons dans un premier temps suivi la localisation de la protéine ARFP dans la cellule. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les interactants potentiels d'ARFP dans la cellule hépatique par un criblage double-hybride dans la levure, et commencé la caractérisation de ces interactions. Nous avons également évalué l'interaction d'ARFP avec d'autres protéines du VHC. Finalement, nous avons construit une batterie d'outils biologiques pour la poursuite de cette étude, des lignées stables, des adénovirus recombinants exprimant la protéine ARFP, et un génome VHC infectieux muté dans les sites d'initiation de la traduction de la protéine ARFP.

En étudiant en parallèle l'initiation de la traduction et la fonction de la protéine ARFP, nous avons accumulé des indices qui nous permettent de prouver l'existence de cette protéine en lignée cellulaire. Le but ultime de ce travail serait de démontrer son rôle au cours de l'infection virale naturelle et ainsi d'élucider sa fonction.

C. MATERIEL ET METHODES

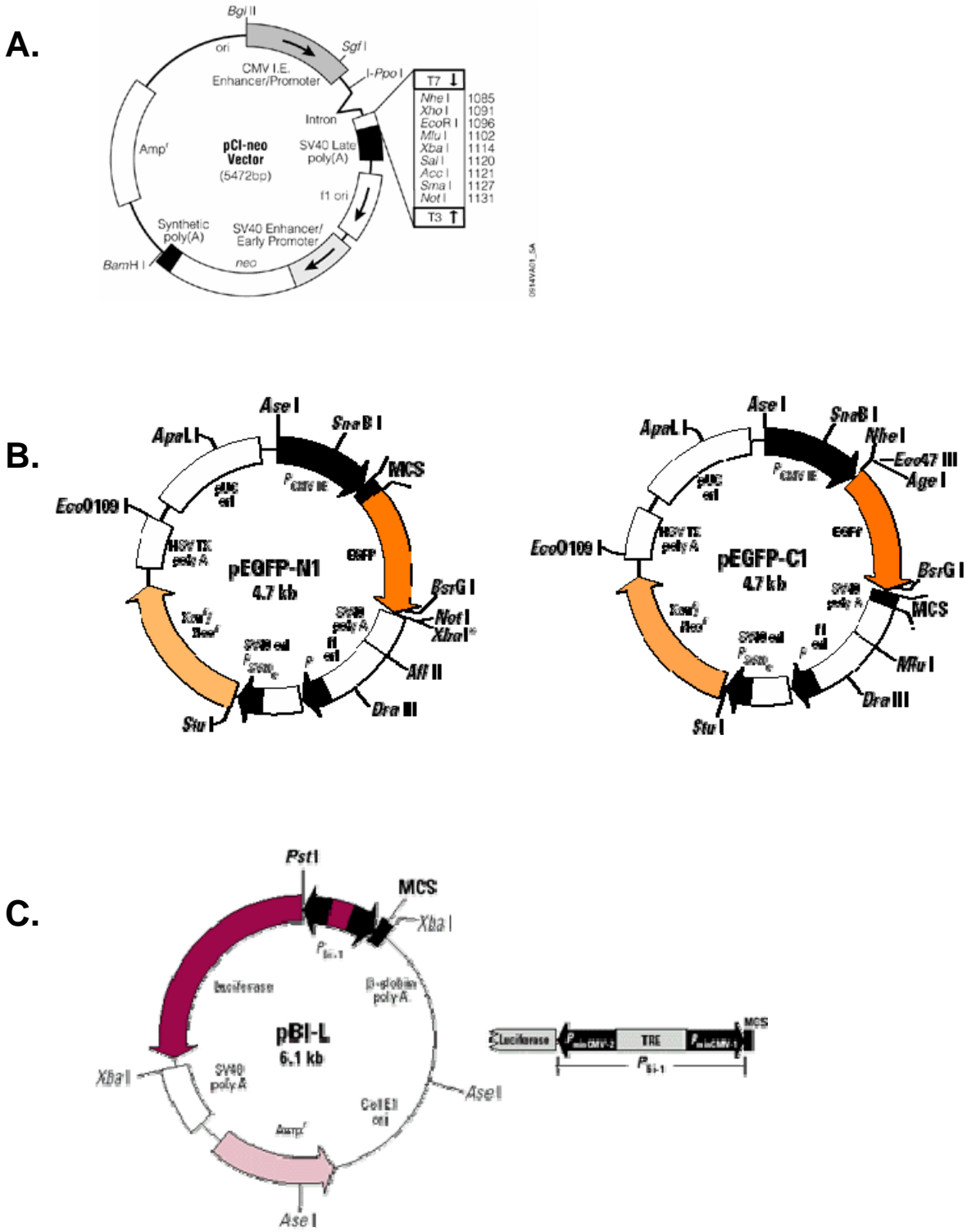


Figure 37. Cartes des vecteurs utilisés pour (A) l'expression de gènes en cellule eucaryote, (B) l'étude de la localisation de protéines en fusion au marqueur EGFP, (C) la construction de lignées stables, (D) l'expression de gènes dans la levure ou (E) dans la bactérie en fusion à la GST et (F) la construction d'adénovirus recombinants (les régions adénovirales sont représentées en bleu).

I. Matériel

I.1 Vecteurs plasmidiques

Les cartes des plasmides commerciaux utilisés sont présentées dans la **figure 37**.

I.1.1 p90/HCV FL long pU

Le clone p90/HCV FL-Long pU (Kolykhalov et al., 1997) code l'ensemble du génome VHC-H77 (génotype 1a). Ce plasmide nous a été fourni par le Dr C.M. Rice (USA).

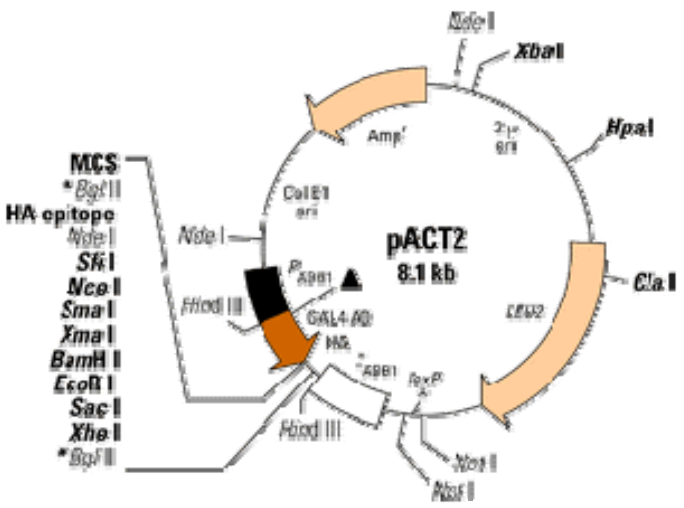
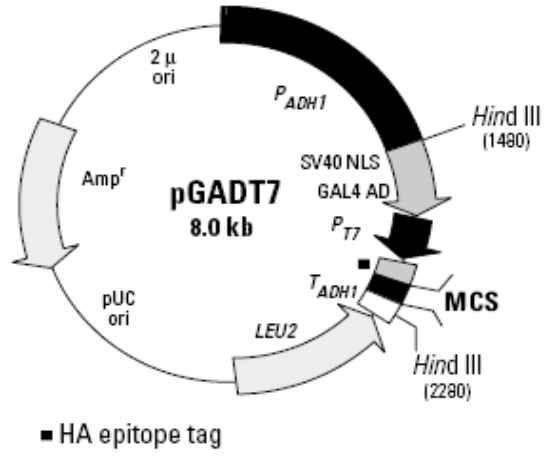
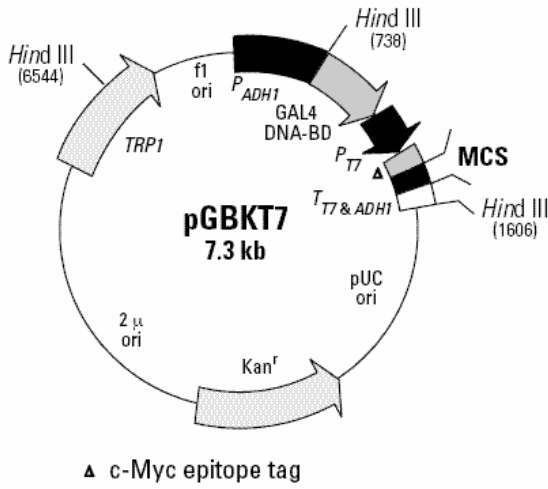
I.1.2 pCI-neo

La plupart de nos clonages sont réalisés dans pCI-neo (Promega). Ce plasmide est un vecteur d'expression eucaryote qui contient la région promotrice/activateur (enhancer) du cytomégalovirus humain en amont de la cassette de clonage (**Fig. 37A**). La cassette de clonage est bordée en 5' et 3' par les promoteurs de transcription T7 et T3 respectivement. Ce vecteur contient deux gènes de résistance : à la néomycine, qui est un marqueur de sélection dans les cellules de mammifères, et à l'ampicilline pour son amplification en bactérie. pCI-neo peut être utilisé pour des expériences d'expression transitoire ou pour l'établissement de lignées stables.

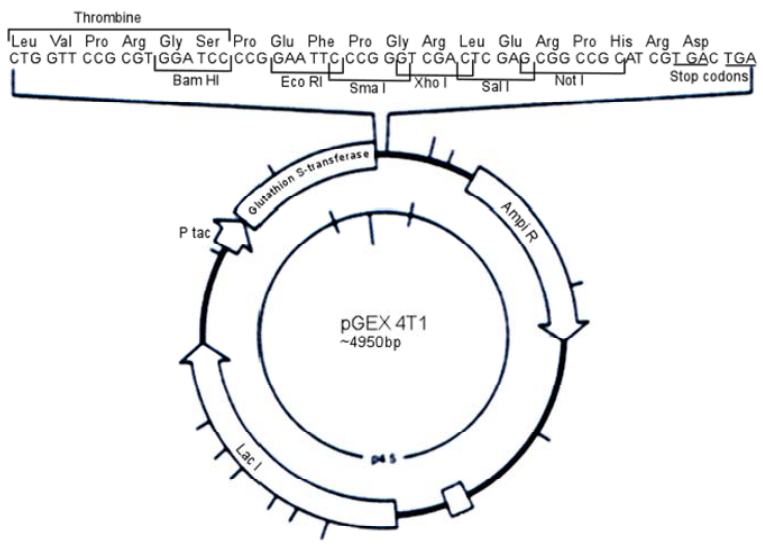
I.1.3 pEGFP-N1 et pEGFP-C1

La protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent protein), un variant de la GFP, est optimisée pour donner une fluorescence très brillante et de hauts niveaux d'expression. Cette protéine a un unique et fort pic d'excitation à 488 nm, parfaitement adapté aux lasers argon et à la cytométrie en flux. Les vecteurs pEGFP-N and -C peuvent être utilisés pour générer des protéines de fusion en N-term ou en C-term de la EGFP respectivement (**Fig. 37B**). Ces vecteurs sont particulièrement adaptés à l'étude de la localisation subcellulaire des protéines.

D.



E.



I.1.4 pBI-L Tet

Le vecteur pBI-L Tet est utilisé pour exprimer un gène d'intérêt et la luciférase à partir d'un promoteur P_{bi-1} bidirectionnel, induit par la tétracycline. P_{bi-1} contient l'élément de réponse Tet (TRE), entre deux promoteurs minimaux CMV (P_{minCMV}), ne possédant pas la partie enhancer du promoteur complet (**Fig. 37C**). P_{bi-1} est silencieux en absence de liaison de TetR ou rTetR aux séquences *tetO*. $P_{minCMV-1}$ contrôle l'expression du gène d'intérêt; et $P_{minCMV-2}$ l'expression de la luciférase.

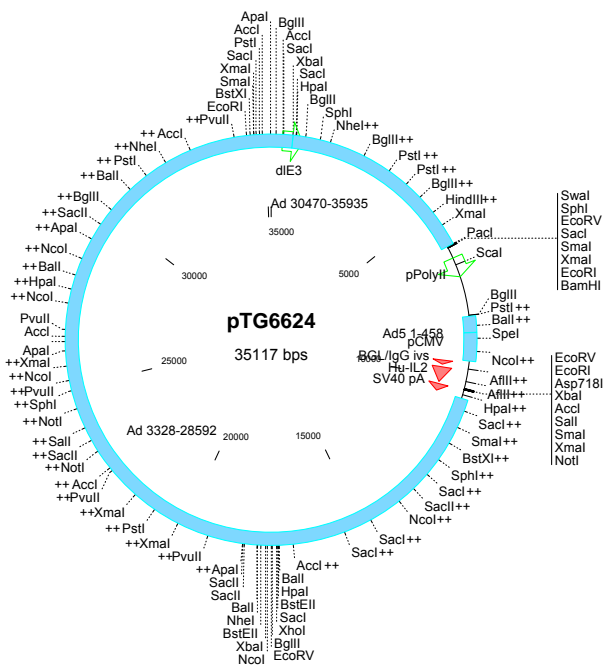
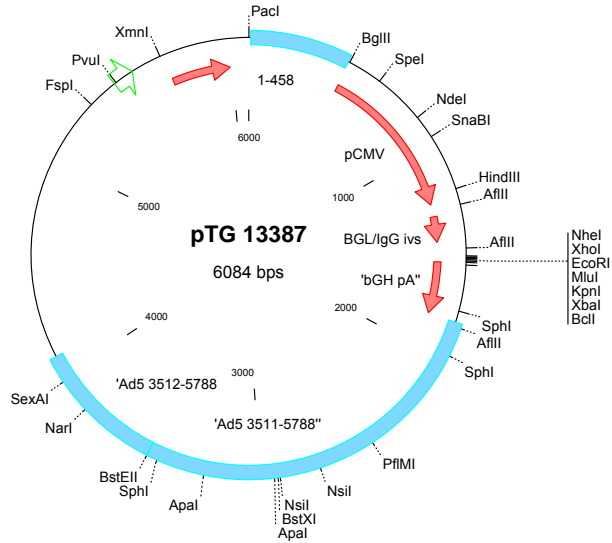
I.1.5 pGBKT7

Le vecteur pGBKT7 exprime des protéines fusionnées aux acides aminés 1–147 du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 (DNA-BD) (**Fig.37D**). Dans la levure, l'expression à haut niveau de protéines de fusion est permise par le promoteur constitutif *ADHI* (P_{ADHI}). La transcription est arrêtée par les signaux de terminaison T7 and *ADHI* (T_{T7} & T_{ADHI}). pGBKT7 contient également le promoteur T7, l'épitope c-myc, et une cassette de clonage. pGBKT7 se réplique de façon autonome dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* via les origines de réplication pUC and 2 μ ori respectivement. Le vecteur porte des marqueurs de sélection : le gène de résistance à la kanamycine (Kan^r) dans *E. coli* et le marqueur de sélection *TRP1* dans la levure.

I.1.6 pGADT7

Le vecteur pGADT7 exprime des protéines en fusion aux acides aminés 768-881 du domaine d'activation (AD) de la protéine GAL4 (**Fig. 37D**). Dans la levure, l'expression des protéines de fusion est sous la dépendance du promoteur constitutif *ADHI* (P_{ADHI}). Le signal de terminaison *ADHI* (T_{ADHI}) est responsable de l'arrêt de la transcription. Les protéines de fusion sont localisées dans le noyau de la levure car la séquence de localisation nucléaire du SV40 a été ajoutée au domaine AD. pGADT7 contient également le promoteur T7, un épitope HA, et une cassette de clonage. Ce vecteur se réplique à partir des origines de réplication pUC and 2 μ respectivement dans *E. coli* et *S. cerevisiae*. Le gène Amp^r permet la sélection dans *E. coli* alors que le gène *LEU2* est un marqueur nutritionnel auxotrophique utilisé pour la sélection dans la levure.

F.



I.1.7 pACT2

pACT2 est un vecteur commercialisé par la société Clontech. Il génère une fusion entre le domaine d'activation de GAL4 AD (acides aminés 768–881), l'épitope HA et une protéine d'intérêt (ou une protéine codée par un ADNc de la banque) clonée dans la cassette de clonage dans les bonnes orientation et phase de lecture (**Fig. 37D**). La protéine de fusion est exprimée à taux élevé dans la levure par le promoteur constitutif ADH1 (*P*); la transcription se finit au niveau du signal de fin de transcription ADH1 (*T*). La protéine est localisée au noyau de la levure car un signal de localisation nucléaire du SV40 a été cloné en 5' du domaine d'activation de GAL4. pACT2 se réplique à la fois dans *E. coli* et *S. cerevisiae* et porte le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline dans *E. coli*. Ce vecteur contient également le gène *LEU2* qui permet aux levures auxotrophes de pousser sur des milieux synthétiques appauvris.

I.1.8 pGEX-4T-1

Ce plasmide provient de la société Amersham. Il contient une cassette de clonage permettant de cloner le gène d'intérêt en fusion avec la glutathione transférase (GST) (**Fig. 37E**). En amont de cette cassette se trouve le site de clivage de la thrombine, qui permet de séparer la GST et la protéine d'intérêt produite. La GST est sous contrôle du promoteur *tac* qui est inductible par l'analogue de lactose isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG). Ce vecteur contient également le gène *lacI^q* qui code un répresseur capable de se fixer au promoteur *tac*, bloquant ainsi l'expression de la protéine de fusion à la GST jusqu'à induction par l'IPTG.

I.1.9 pTG13387

Ce vecteur a été fourni par la société Transgène SA (Strasbourg). Le vecteur de transfert pTG13387 contient, dans la délétion E1 du génome de l'adénovirus, une cassette de clonage entre le promoteur CMV et le signal de polyadénylation du SV40. De part et d'autre de la cassette, il existe deux régions adénovirales homologues aux régions retrouvées dans le vecteur pTG6624 (**Fig. 37F**). Ces régions homologues vont permettre la recombinaison entre les deux vecteurs dans les bactéries BJ5138.

1.1.10 pTG6624

Le vecteur pTG6624, provenant également de la société Transgène, est un plasmide d'environ 35 kb contenant le génome de l'adénovirus humain de type 5, délété des régions E1 et E3. Il contient dans la délétion E1 les deux régions homologues retrouvées dans pTG13387, et entre les deux le gène de résistance à l'ampicilline, qui sera perdu après la recombinaison (**Fig. 37F**). Ce vecteur a été développé pour infecter mais ne pas se répliquer dans les cellules non permissives, et permet ainsi l'expression des protéines recombinantes sans effet cytopathique.

1.2 Souches bactériennes

Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu LB (Bacto-Tryptone 10g/l, Bacto Yeast extract 5g/l, NaCl 10g/l), liquide ou solide (Bacto-agar 15g/l), additionné d'ampicilline à 100µg/ml ou de kanamycine à 30µg/ml.

1.2.1 XL-1 Blue

La souche bactérienne XL1-Blue commerciale (*E. Coli* K-12, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *lac*, (F' : :Tn 10 tet^r), *proA⁺B⁺*, *lacI^fZΔM15*) a été utilisée pour tous les clonages.

1.2.2 BL21

La souche bactérienne BL21 (*E. Coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS* ($r^- m_b^-$) gal) a été utilisée pour les productions de protéines. Cette souche est particulièrement adaptée à la production de protéines car elle ne possède pas les protéases *lon* et *ompT* qui peuvent dégrader la protéine pendant la purification. Facile à induire, elle permet une production de protéine en grande quantité.

1.2.3 BJ5183

La souche BJ5183 (*endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR str^r*) permet la recombinaison homologue nécessaire à la construction des adénovirus recombinants.

1.3 Levures

Nous avons utilisé la souche AH109 (Clontech) dont le génotype est le suivant : *MAT α* , *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2 ::GAL1_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *ura3 ::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*.

L'autre souche utilisée est Y187 (Clontech), le partenaire de AH109 pour le mating. Son génotype est *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *mef*, *gal4D*, *gal80D*, *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*.

AH109 et Y187 sont maintenues dans du milieu YPD liquide (20 g/L Difco peptone, 10 g/L yeast extract) ou solide (+20 g/L agar) à 30°C.

1.4 Virus

1.4.1 Adénovirus recombinants.

L'adénovirus recombinant codant la GFP (Ad285) a été construit au laboratoire par JD. Abraham et sert de contrôle lors des expériences d'infection par adénovirus. Ad1053 code toutes les protéines non structurales du VHC (NS2 à NS5B) est décrit dans Dimitrova *et al*, 2003.

1.4.2 Virus recombinant de la vaccine

La souche sauvage du virus de la vaccine, souche Copenhagen, a été fournie par la société Transgène SA. vvIV205 est le virus recombinant de la vaccine codant les protéines structurales (core-E1-E2) du VHC, et a été construit au laboratoire par F. Kien.

1.5 Lignées cellulaires

1.5.1 Lignée Huh-7

Cette lignée cellulaire humaine, dérivée d'un hépatocarcinome (Nakabayashi *et al.*, 1982), nous a été donnée par le laboratoire du Dr R. Bartenschlager (Mainz, Germany). Les cellules Huh-7 sont cultivées dans du milieu Dulbecco's modified minimal essential medium

(DMEM, Gibco) complété avec 10% sérum de veau foetal (SVF), 2mM de Glutamax, (L-Alanyl-L-Glutamine, Gibco) d'un mélange d'acides aminés non essentiels 1X (Gibco), de 1mM de Pyruvate de Sodium et de 50µg/ml de Gentamycine. La densité optimale d'ensemencement est de 5×10^5 cellules par flacon de 75 cm².

1.5.2 Lignée HEK 293

Il s'agit d'une lignée cellulaire humaine provenant de rein embryonnaire (ATCC n° CRL-1573). Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu DMEM complété avec 10% de SVF, 2mM de Glutamax et de 50µg/ml de Gentamycine. La densité optimale d'ensemencement est de 5×10^5 cellules par flacon de 75 cm². Cette lignée produit de manière constitutive le gène E1 de l'adénovirus humain en *trans*, permettant la production de particules adénovirales infectieuses quand ces cellules sont transfectées avec un vecteur adénoviral délété de la région E1. Cette lignée est utilisée pour la production d'adénovirus recombinants.

1.5.3 HeLa

Cette lignée cellulaire est issue d'un adénocarcinome humain du col de l'utérus (ATCC n°CCL-2). Les cellules HeLa sont maintenues dans du milieu DMEM à 10% SVF, 2mM de Glutamax et 50 µg/ml de Gentamycine. Elles sont ensemencées à 3×10^5 cellules par flacon de 75 cm².

Nom de l'adénovirus	Nom dans pTG13387	Nom dans pTG6624	Transgène
Ad1080	pIV1210	pIV1250	Core
Ad1081	pIV1211	pIV1251	fARFP forcée
Ad1082	pIV1212	pIV1252	Core Δ fARFP
Ad1083	pIV1213	pIV1253	fARFP forcée Δ Core
Ad1084	pIV1339	pIV1340	ARF ph0-HA
Ad1085	pIV1342	pIV1343	ARF Δ Core ph0-HA
Ad1086	pIV1341	pIV1346	ii86/88ARFP-HA
Ad1087	pIV1353	pIV1358	ARF ph+1-HA
Ad1088	pIV1354	pIV1359	ARF Δ Core ph+1-HA
Ad1089	pIV1355	pIV1360	ii86/88ARFP-HA
Ad1090	pIV1356	pIV1361	ARF Δ fARFP ph+1-HA
Ad1091	pIV1357	pIV1362	fARFP forcée-HA

Tableau 4. Récapitulatif des adénovirus recombinants construits et des plasmides intermédiaires utilisés.

II. Méthodes de Virologie

II.1 Génération d'adénovirus recombinants non répliatifs

Le vecteur adénoviral le plus couramment utilisé, l'adénovirus humain de sérotype 5, est délété des régions E1 et E3 : il ne se réplique pas mais peut infecter des cellules permissives. Le gène E1 est essentiel pour l'assemblage des particules virales infectieuses, et est complété *in vivo* lors de l'infection d'une lignée cellulaire exprimant constitutivement la protéine E1, telle HEK293. Le gène E3 code des protéines impliquées dans l'évasion du virus au système immunitaire de l'hôte, et n'est pas nécessaire au cycle viral. Ces délétions n'empêchent pas seulement la répliation de l'adénovirus, mais créent un espace de 7.5 kb où de l'ADN non adénoviral pourra être inséré. Deux méthodes ont traditionnellement été utilisées pour générer des adénovirus recombinants. La première implique la ligation directe du gène d'intérêt dans le génome adénoviral. La rareté des sites uniques de restriction et la grande taille du génome (35 kb) rendent cette technique difficile à mettre en œuvre. La deuxième méthode, la plus couramment utilisée, consiste à cloner le gène d'intérêt dans un vecteur de transfert (ou navette), puis à le transférer dans le vecteur contenant le génome. Le transfert est réalisé par recombinaison homologue dans la souche BJ5381. Les adénovirus construits sont résumés dans le **tableau 4**.

II.1.1 Clonage dans le vecteur de transfert

Le gène d'intérêt est inséré au niveau de la délétion E1 du vecteur de transfert pTG1338, dans la cassette de clonage. Le plasmide ainsi créé est digéré par *PacI*, situé en 5' de la 1^{ère} région homologue, et par une autre enzyme de restriction dont le site est situé dans la deuxième région. Après digestion et purification, on obtient un fragment contenant le gène désiré bordé en 5' et 3' de larges régions adénovirales.

II.1.2 Recombinaison homologue

5 µg de vecteur pTG6624, contenant le génome adénoviral délété des régions E1 et E3, sont digérés par *Cla*I. Le vecteur ainsi linéarisé et le fragment précédemment obtenu sont mélangés dans un rapport 1/10 dans un volume maximal de 10 µl, et sont utilisés pour transformer 100 µl de bactéries BJ5183. Après étalement sur milieu solide sélectif, seules pousseront les bactéries ayant réalisé la recombinaison homologue entre les deux fragments d'ADN.

II.1.3 Production de virus recombinant

10⁶ cellules HEK293 sontensemencées dans une boîte de 6 cm de diamètre, et transfectées avec 5 µg de pTG6624 préalablement linéarisé contenant le transgène d'intérêt (J0). Le lendemain, les cellules sont lavées et le milieu changé (DMEM 2%SVF). 7 jours plus tard, 1 ml de milieu à 2%SVF est ajouté et la lyse cellulaire commence. Le surnageant est récupéré quand la lyse est totale (≈J10). Ce premier passage, appelé P1, est congelé à -80°C. Après décongélation brutale à 37°C, 200 ou 400 µl de P1 servent à infecter 2 flasques de 75 cm² de HEK293 contenant 20 ml de DMEM à 5%SVF. Aux alentours de J14, les cellules lysées et le surnageant sont récupérés, soumis à 3 cycles de congélation à l'azote/décongélation à 37°C pour libérer tous les virions contenus dans les cellules. Les lysats obtenus sont centrifugés 5 min à 500g pour éliminer les débris cellulaires. Ce dernier passage, appelé P2, est utilisé pour les expériences d'infection.

II.2 Titrage des adénovirus recombinants

Des cellules HEK293 sontensemencées sur des plaques 8 puits (Labteck, 2x10⁵ cellules par puits). Elles sont ensuite infectées par 200 µl de dilutions du stock viral (de 10⁻² à 9,7x10⁻⁸). Après 16h à 37°C, les cellules sont fixées par du méthanol/acétone 20 min à -20°C. Les lames sont séchées à l'air libre, saturées au PBS+1% SVF 30 min à température ambiante. L'anticorps primaire, surnageant de l'hybridome α72K B6-8, est dilué au 1/10^e dans du PBS-1% SVF et incubé 45 min sur les lames. Après trois lavages de 5 min au PBS+1% SVF, une dilution d'un anti-IgG de souris couplé au FITC est incubée 30 min à température ambiante avec les cellules. 3 nouveaux lavages sont effectués. Des lamelles sont montées sur les lames avec un mélange glycérine/PBS, et sont lues en microscopie à

fluorescence au grossissement 40x. Le nombre moyen de cellules fluorescentes par champ (N) doit diminuer proportionnellement à la concentration de virus. Le titre est donné par la formule suivante

$$[\text{Adénovirus}] = N \times 5 \times 260 \times (1/\text{dilution})$$

5 pour revenir au ml, 260 car le champ observé au grossissement 40x est 260x plus petit que la surface du puits. Le titre est exprimé en unités infectieuses par ml (IU/ml).

II.3 Protocole d'infection par les adénovirus recombinants

Les cellules à infecter sont lavées, et placées dans un volume minimal de PBS. Le volume d'adénovirus recombinant correspondant à la MOI désirée est ajouté dans le milieu. Après incubation 30 min à température ambiante, on estime que l'adsorption du virus aux cellules est optimale. Le virus est enlevé par lavage au PBS et les cellules sont remises en culture dans du milieu appauvri en SVF (5%). L'expression optimale du transgène est obtenue de 24 à 72h post infection.

II.4 Protocole d'infection par le virus recombinant de la Vaccine souche MVA

Le virus recombinant de la Vaccine souche MVA (Modified Vaccinia Ankara virus) est un virus atténué non virulent chez l'animal sain ou immunodéprimé, et n'a pas provoqué d'effets indésirables chez l'humain lors des campagnes d'éradication de la variole. Il est cependant manipulé avec précaution sous hotte, en portant des lunettes de protection. Le virus est ajouté à une MOI définie sur des cellules lavées et placées dans un faible volume de PBS. Après une incubation de 30 min à température ambiante, les cellules sont replacées dans du milieu à 5%SVF. 16 h après infection les protéines recombinantes sont exprimées de façon optimale.

	Séquence 5' > 3'	Se ns	Définition	Zone d'hybridation	Modification
1000	GGAATTCGCCAGCCCCCTGATG	S	Région 5' NTR du VHC (IRES)	nt1>nt15	EcoRI
1100	CCTAAACCTCAAAAAAAAAACCAAC	S	Mutation +1 site frameshift	nt354>nt375	
1101	TGGTTTTTTTTTTGAGGTTT	AS	Mutation +1 site frameshift	nt377>nt351	
1102	GGAATTCATGAGCACGAATCCTAACCT	S	ATG Core	nt342>nt362	EcoRI
1103	CGCGGATCCTGTTGCATAGTTCAC	AS	Région Cterm ARFP avec STOP	nt500>nt487	BamHI
1104	GGAATTCGTCCTCCAGAACC	AS	Région Cterm ARFP sans STOP	nt483>nt469	EcoRI
1105	GGAATTCTGTTGCATAGTTCAC	AS	Région Cterm ARFP avec STOP	nt500>nt486	EcoRI
1119	GGAATTCACGGTTGGTGTAC	AS	Site de frameshift ph-1	nt392>nt379	EcoRI
1120	GGAATTCACAAGTAACTC	AS	Site FS + tige-boucle ph-1	nt452>nt438	EcoRI
1121	GGAATTCACGGGGAGACAGGAG	AS	Site FS+ TB + pseudo-nœud ph-1	nt644>nt630	EcoRI
1128	GGAATTCATGAGCACGAATCCTAACCT	S	ATG Core	nt342>nt362	EcoRI
1129	GCTCTAGATTATGAAGCGGGCAGGTCAG	AS	Région Cterm Core avec STOP	nt911>nt894	XbaI
1130	GGAATTCGCCATCCCGCCA	AS	ARF complet ph0	nt630>nt618	EcoRI
1131	GGAATTCGGTTGGTGTAC	AS	Site de frameshift ph+1	nt391>nt379	EcoRI
1132	GGAATTCACAAGTAACTC	AS	Site FS + tige-boucle ph+1	nt450>nt438	EcoRI
1133	GGAATTCGGGGAGACAGGAG	AS	Site FS + TB + pseudo-nœud ph+1	nt643>nt630	EcoRI
1138	GGAATTCTGGTGGAGTTTACTTGTG	AS	Région en aval site FS+SL ph0	nt434>nt416	EcoRI
1139	GGAATTCGGCGACGGTTGGTGT	AS	Site frameshift ph0	nt396>nt378	EcoRI
1140	GGAATTCGCAACAAGTAACTCCACC	AS	Site FS + tige-boucle ph0	nt455>nt435	EcoRI
1141	GGAATTCAGACGCCAAAAACATA	S	5' de la luciférase sans ATG		EcoRI
1142	CCTCTAGAACTAGTGGATCCCCC	AS	3' de la luciférase avec STOP		XbaI
1157	GGAATTCGCTCTCCAGAAC	AS	Région Cterm ARFP sans STOP ph0	nt822>nt809	EcoRI
1158	GGAATTCCTGCTCTCCAGAAC	AS	Région Cterm ARFP sans STOP ph+1	nt823>nt808	EcoRI
1212	AACCGTCGCCCATAGGACGTCAAGTTCCC	S	Mutation delta Core (aa20>STOP)	nt387>nt415	
1213	GGGAACCTGACGTCTATGGGCGACGGTT	AS	Mutation delta Core (aa20>STOP)	nt415>nt387	
1214	GCCACAGGACGTAAAGTTCCCGGGT	S	Mutation delta ARFP (aa22>STOP)	nt394>nt420	
1215	CACCCGGAACTTTACGTCTGTGGGC	AS	Mutation delta ARFP (aa22>STOP)	nt420>nt394	
1217	GCTCTAGATGTTGCATAGTTCAC	AS	Région Cterm ARFP avec STOP	nt909>nt896	XbaI
1240	GCTCTAGAAAACACTCCA	S	Région 5' du 3'NTR	nt9204>nt9221	XbaI
1241	ACGCGTCGACATGATCTGCAGAGAGGCC	AS	Région 3' du 3'NTR	nt9651>nt9629S	Sall
1244	CCGTCGCCCATAGGACGTAAAGTTCCCGGG	S	Mutation delta Core et delta ARFP	nt389>nt418	
1245	CCCGGAACTTTACGTCTATGGGCGACGG	AS	Mutation delta Core et delta ARFP	nt418>nt389	
1263	GGAATTCGCCGTCTCCAGAA	AS	Région Ct de ARFP sans STOP	nt484>nt476	EcoRI
1264	GGAATTCATACGACGTACCAGATTACGCT	S	Synthèse tag HA		EcoRI
1265	GCTCTAGAGCAGCGTAATCTGGTACGT	AS	Synthèse tag HA		XbaI + STOP
1266	GGCGCCAGATCGTAGCGGAGTATACTTG	S	Mutation aa31>stop ph+1 sur clone JFH1		
1267	CAAGTATACTCCGCTACGATCTGGCCGCC	AS	Mutation aa31>stop ph+1 sur clone JFH1		
1268	GGCCCTATACGGGAACGAGGGACTAGGCTGGGC	S	Mutation aa87/89/92>STOP ph+1 sur clone JFH1		
1269	GCCCAGCCTAGTCCCTCGTCCCGTATAGCGGCC	AS	Mutation aa87/89/92>STOP ph+1 sur clone JFH1		
1273	GGAATTCATGGCAATGAGGGTTGCGGGT	S	Région Nterm ii86/88ARFP		

Tableau 5. Récapitulatif des oligonucléotides utilisés.

III. Méthodes de Biologie Moléculaire et cellulaire

III.1 Méthodes concernant les acides nucléiques

III.1.1 Amplification et préparation de fragments d'ADN

Les séquences des oligonucléotides et leurs zones d'hybridation sont données dans le **tableau 5**. Toutes les amplifications d'ADN par PCR ont été réalisées en utilisant l'élongase (Invitrogen), une polymérase modifiée garantissant une grande fidélité de transcription. La concentration optimale en magnésium dans le milieu est de 1,8 mM. Après une phase de dénaturation (2' à 94°), 30 cycles d'amplification (30'' à 94°C ; 30'' à Tm-2°C, 30'' 68°C), et une phase d'élongation finale (5' à 68°C), la taille du fragment amplifié est vérifiée sur gel d'agarose et le fragment est purifié (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen).

La préparation des fragments d'ADN et des vecteurs est réalisée suivant les protocoles classiques de biologie moléculaire (Molecular cloning, a laboratory manual, Sambrook, Fritsch, Maniatis). Toutes les enzymes sont utilisées selon les protocoles et avec les réactifs fournis par les fabricants (Invitrogen, Amersham Biosciences).

III.1.2 Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries XL-1 Blue sont étalées sur milieu LB et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain une colonie est ensemencée dans 25 ml de milieu TYM BROTH (bactotryptone/tryptone peptone 20g/l (Difco), 5g/l yeast extract (Difco), NaCl 100mM, MgSO₄·7 H₂O 10mM). Après une nuit à 37°C sous agitation, la culture est diluée dans 500 ml de milieu THYM BROTH. La DO_{600nm} est mesurée régulièrement jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 0,48 et 0,52. La culture est alors refroidie sur de la glace puis centrifugée pendant 15min à 4000g. Le culot bactérien est repris délicatement dans 100ml de tampon TFB I froid (AcK 30mM, MnCl₂ 2 H₂O 50mM, KCl 100mM, CaCl₂ 10mM, glycérol 15% (v/v)). La suspension est centrifugée pendant 8min à 4000g. Le culot est ensuite repris dans 20ml de tampon TFB II froid (NaMOPS 10mM, pH 7, KCl 10mM, CaCl₂ 75mM, glycérol 15% (v/v)) et les bactéries

compétentes sont aliquotées à raison de 200µl par microtube. Les microtubes sont ensuite plongés dans un mélange carboglace/éthanol jusqu'à congélation de la suspension bactérienne et sont conservés à -80°C. Cent µl de bactéries compétentes sont utilisés par transformation.

III.1.3 Transformation de bactéries compétentes

Vingt à 50 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes préalablement décongelées sur de la glace. Après une incubation de 10 min dans la glace, le mélange est soumis à un choc thermique (1min 30 à 37°C), puis les bactéries sont à nouveau placées sur la glace pendant 1 min 30 avant d'être étalées sur milieu sélectif contenant un antibiotique. La nature de l'antibiotique dépend du gène de résistance porté par le vecteur utilisé au cours de l'étude. Les concentrations en antibiotique sont de 100µg/ml pour l'ampicilline et 30 µg/ml pour la kanamycine.

III.1.4 Préparations d'ADN plasmidique

Les minipréparations d'ADN sont préparées par la méthode de lyse alcaline. Une colonie bactérienne estensemencée dans 3 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat et cultivée pendant au moins sept heures à 37°C. Le lendemain, 1,5 ml de culture bactérienne saturée sont centrifugés pendant 45sec à 10000g. Le culot bactérien est repris dans 100µl de tampon 1 (Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 10mM, 100µg/ml de RNase A). La suspension bactérienne est mélangée à 200µl de tampon 2 (200mM NaOH, 1% Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) (p/v)). Ce tampon assure la lyse des bactéries par l'action du SDS et la dénaturation des acides nucléiques et des protéines par la soude. L'addition de 200µl de chloroforme permet la précipitation des protéines. Le mélange est ensuite neutralisé par 150µl de tampon 3 (3M acétate de potassium pH5,5) qui permet préférentiellement la renaturation de l'ADN plasmidique. Après centrifugation, le surnageant contenant le plasmide, est précipité par 1 ml d'éthanol absolu. Après centrifugation à 10000g durant 10 min le culot est lavé à l'éthanol 70% et repris dans 50 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM). L'ADN obtenu est ensuite analysé par digestion enzymatique.

Dans le cas des maxipréparations, l'ADN plasmidique est extrait par la méthode de lyse alcaline en utilisant le kit QIAGEN Plasmid Maxi. Le principe est le même que dans le cas des minipréparations. L'ADN plasmidique est repris dans de l'eau, quantifié par mesure de la densité optique à 260nm. Sa pureté est estimée par le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} et sa

concentration est ajustée à 1µg/µl. Le plasmide produit est ensuite soumis à des digestions enzymatiques de contrôle.

III.1.5 Constructions plasmidiques réalisées

Les caractéristiques de tous les plasmides construits au cours de ma thèse sont données dans l'**annexe II**.

III.1.5.1 Constructions en fusion à la GFP

La séquence de la protéine EGFP provenant de pEGFP-C1 ou pEGFP-N1 et les cassettes de clonage attenantes ont été clonées dans le vecteur pCI-neo, générant pIV1096 et pIV1072. Tous les plasmides codant des protéines de fusion à la protéine EGFP ont été construits par sous-clonage dans ces deux vecteurs.

III.1.5.2 Construction en fusion à la luciférase

Le gène de la luciférase a été sous cloné à partir du vecteur pBI-L dans les sites *EcoRI-XbaI* de pCI-neo dans un premier temps, générant pIV1066. Les premiers dosages de la luciférase avec des fusions réalisées dans le site *EcoRI* de pIV1066 ont montré un bruit de fond très important. Un deuxième vecteur a donc été construit, délété du codon d'initiation de la luciférase. Ce plasmide, appelé pIV1115, a été utilisé pour tous les clonages en fusion à la luciférase.

III.1.5.3 Constructions en fusion au tag HA

La séquence de l'épitope HA, obtenue par hybridation d'oligonucléotides complémentaires, a été clonée dans les sites *EcoRI-XbaI* de pTG13387, générant pIV1338. Différentes séquences ont ensuite été clonées dans le site *EcoRI* de pIV1338, et seront exprimées en fusion au tag HA.

III.1.5.4 Constructions en fusion à la GST

La séquence de la protéine ii_{86/88}ARFP a été clonée dans le site *EcoRI* de pGEX-4T-1 pour donner pIV1348. La capacité des clones obtenus à produire la protéine de fusion à la GST a été testée : 5 ml de milieu LB + ampicilline sontensemencés avec 500 µl de culture saturée, incubés 1h à 37°C, et induits 4h en présence de 100 mM d'IPTG. Les cultures

mélangés et incubés pendant 30min à température ambiante. En parallèle, 5 µg d'ADN sont ajoutés à un mélange de 100µl d'optiMEM et de 10µl de Plus Reagent (Invitrogen), un réactif qui permet d'augmenter l'efficacité de transfection pour cette lignée cellulaire. Les contenus des deux tubes sont ensuite mélangés et laissés à température ambiante pendant 30min. Durant cette période, les liposomes de transfert vont se former. Ils sont ensuite mis au contact des cellules. Cinq à 12 h après la transfection, on ajoute 4 ml de milieu de culture pour cellules Huh-7. Les cellules sont ensuite réincubées pendant 12h.

III.3 Test luciférase

III.3.1 A partir de lysats cellulaires

Quarante huit heures après la transfection, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS sans calcium ni magnésium (Gibco) et reprises dans 250µl de tampon de lyse (Tris-Phosphate pH 7,8 25 mM; DTT 2 mM, acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tétraacétique 2mM; glycérol 10%; Triton X-100 1%) (Promega). Après une centrifugation de 15 sec à 10.000g, qui permet d'éliminer les débris membranaires et l'ADN génomique, le surnageant constitue l'extrait enzymatique. Le dosage est réalisé avec 5µl de l'extrait enzymatique mis en présence de 25µl de réactif luciférase (Promega) qui contient de l'ATP et du magnésium, mais dont la composition exacte n'est pas divulguée par le fournisseur. La lumière émise est immédiatement mesurée à l'aide d'un luminomètre (TD20/20). Dans nos conditions, la mesure se fait pendant un temps de 10 sec. Ce système très sensible est basé sur la production de lumière lors de l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine, réaction catalysée par la luciférase en présence d'ATP et de magnésium.

III.3.2 A partir de milieu réactionnel in vitro

III.3.2.1 Transcription in vitro

Les ARNs ont été produits en utilisant le kit Promega T7 Riboprobe System et un protocole permettant une synthèse en grande quantité (de l'ordre de 5 à 10 µg d'ARN/µg d'ADN matrice). En résumé, 5 µg d'ADN matrice sont linéarisés, incubés 2h à 37°C en présence de 40 unités de T7 polymérase, de 0,5 mM de chaque rNTP, de 100 unités de RNAsine et de 10mM DTT. L'ADN matrice est ensuite éliminé par addition de 5 unités de

DNase dans le milieu réactionnel et incubation 15 min à 37°C. L'ARN est récupéré par extraction au phénol-chloroforme, dosé, et sa taille et son intégrité sont vérifiées sur gel MOPS-formaldéhyde.

III.3.2.2 Traduction in vitro

L'ARN obtenu par transcription in vitro est ensuite traduit selon le protocole du kit Promega Rabbit Reticulocyte Lysate. 2 µg d'ARN sont mis en présence de 35 µl de lysat de réticulocytes de lapin, 0,1 mM de mélange d'acides aminés sans Leucine, 0,1 mM de mélange d'acides aminés sans Méthionine, de 40 unités de RNAsine et l'ensemble est incubé 90 min à 37°C.

III.3.2.3 Dosage de la luciférase

5 µl de milieu réactionnel (1/10^e de la réaction) sont mélangés à 25 µl de réactif luciférase (Promega). La mesure de la lumière émise se fait pendant 10 sec dans le luminomètre.

III.4 Western blot

III.4.1 Préparation de lysats cellulaires

Les cellules sont lavées deux fois au PBS, puis lysées avec du tampon de lyse luciférase ((Tris-Phosphate pH 7,8 25 mM; DTT 2 mM, acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tétraacétique 2mM; glycérol 10%; Triton X-100 1%) (Promega) pendant 15 min à température ambiante. Le volume de tampon de lyse varie entre 50-250 µl par boîte de 6 cm de diamètre, en fonction de l'expression de la protéine à identifier. Du tampon de charge 6X (360 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 12% SDS ; 36% glycérol ; 6% 2-Mercaptoéthanol ; 0,0036% Bleu de Bromophénol) est ajouté au lysat, qui est ensuite soniqué 10 sec et finalement chauffé 5 min à 95°C.

III.4.2 Gels Tris-glycine en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines ainsi dénaturées sont déposées sur gel composé de deux parties à pH discontinu: le gel de concentration (5% d'acrylamide 37;5:1, 0,1% SDS, 375 mM Tris-HCl, pH6.8) et le gel de séparation (10-15% d'acrylamide 37,5:1, 1% SDS, 145 mM Tris-HCl,

pH8.8). L'électrophorèse est réalisée à 100V dans du tampon de migration Tris/Glycine/SDS (0,025 M Tris, pH 8.3 ; 0.192 M glycine ; 0,1% SDS) dans l'appareil vertical Mini-PROTEAN (Biorad).

III.4.3 Gels Tris-tricine

Ce type de gel permet une meilleure résolution des protéines de petit poids moléculaire. Il se compose de deux parties à pH constant : le gel de concentration (4% acrylamide 37,5:1, 0,2% SDS, 750 mM Tris-HCl, pH8.45) et le gel de séparation (10-15% acrylamide 37,5:1, 0,25% SDS, 1 M Tris-HCl, 10% glycérol, pH8.45). La migration est réalisée à 80 V avec deux tampons différents, un pour chaque compartiment de la cuve d'électrophorèse (Mini-PROTEAN, Biorad) : le tampon Tris-tricine de cathode (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS) et d'anode (0,2 M Tris-HCl, pH8.9).

III.4.4 Transfert sur membrane PVDF

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride), type Hybond-P (Amersham), préalablement trempée 10 sec dans du méthanol et équilibrée dans du tampon de transfert (0,025 M Tris, pH 8,3 ; 0.192 M glycine, 20% éthanol). La membrane est déposée sur le gel entre trois feuilles de papier Watmann, puis entre deux éponges, tous préalablement saturés avec le tampon de transfert. Le transfert est réalisé dans l'appareil Mini-PROTEAN (Biorad) 1h à 350 mA, sous agitation et avec un système de refroidissement. A la fin du transfert, la membrane est à nouveau trempée quelques sec dans du méthanol, et peut être révélée par immunodétection.

III.4.5 Immunodétection des protéines transférées

Tous les lavages de cette étape sont réalisés dans du PBS-Tween 20 0,1%. La membrane est lavée puis incubée 1h à température ambiante dans du PBS-Tween 20 0,1%-lait écrémé 5% de façon à bloquer les sites aspécifiques. Elle est ensuite rincée 2 fois et incubée en présence d'un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine d'intérêt, dans du PBS-Tween 20 0,1%-lait écrémé 1%, 1 à 2h à température ambiante. Après 2 rinçages et 3 lavages de 15-10-5 min la membrane est incubée une heure en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris directement couplé à la peroxydase, dilué au 1/5000^e.(Amersham). Elle est ensuite rincée 2 fois et lavée 3 fois, et les complexes antigène-anticorps fixés à la membrane

sont révélés par chimioluminescence (kit ECL, Amersham) : après 1 min de contact avec le réactif, la membrane est exposée de quelques secondes à quelques heures sur film photosensible (Kodak BioMax).

III.5 Double hybride dans la levure

III.5.1 Choix de la banque à cribler

Les banques d'ADNc Matchmaker™ (Clontech) sont des banques prétransformées dans la levure, optimisées pour les expériences de simple hybride (interactions protéine-ADN) ou double hybride (interaction protéine-protéine). Elles sont construites dans le vecteur pACT2, exprimant chaque ADNc en fusion avec domaine d'activation de GAL4. Cette banque est amplifiée en bactérie, les plasmides isolés, et transformés dans la souche de levure Y187 par la méthode de l'acétate de lithium. Les colonies résultantes sont isolées sur boîtes, cultivées à haute densité, aliquotées et stockées à -80°C.

III.5.2 Construction de l'hameçon

Dans un premier temps, nous avons construit par PCR triple un plasmide contenant la séquence de la protéine ARFP où l'événement de décalage de cadre de lecture est mimé. Ceci signifie que nous avons inséré 2 nucléotides au niveau du codon 11, « forçant » en quelque sorte le frameshift -2/+1. Ce clonage est réalisé dans pGAD-T7, en fusion au domaine d'activation de GAL4, et le plasmide résultant est appelé pIV1065. La séquence correspondant à ARFP « forcée » est ensuite insérée dans les sites *EcoRI-BamHI* de pGBK-T7, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Cette construction est appelée pIV1065.

III.5.3 Mating

pIV1067 est transformé dans la souche AH109, étalé sur boîte SD/-Leu. Une colonie estensemencée dans 50 ml de milieu SD/-Leu liquide, et la culture est incubée de 16 à 24h à 30° sous agitation (250 rpm), jusqu'à atteindre une $DO_{600nm} > 0,8$. La culture est centrifugée 5 min à 1000g, et resuspendue dans le milieu résiduel (<5 ml), puis mélangée à 1 ml de la banque prétransformée dans 45 ml de YPDA/Kan 2X (40 g/L Difco peptone, 20 g/L Yeast

extract, 4% dextrose, 0,006% adénine, 20 mg/ml kanamycine). L'ensemble est incubé de 16 à 24h à 30°C sous agitation douce (50 rpm), puis centrifugé 10 min à 1000 g. Le culot est resuspendu dans 5 ml de YPDA/Kan 0.5X (10 g/L Difco peptone, 5 g/L Yeast extract, 1% dextrose, 0,0015% adénine, 5 mg/ml kanamycine). 100 µl de dilutions au 1/10000^e, 1/1000^e, 1/100^e et 1/10^e sont étalées sur boîtes SD/-Leu/-Trp pour estimer l'efficacité de mating.

III.5.4 Criblage de la banque

Le reste de la culture est étalé sur environ 50 boîtes de 15 cm de diamètre SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade à raison de 200µl par boîte. Les colonies apparaissent après 8/21 jours d'incubation à 30°C et sont ensuite repiquées sur boîtes SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade contenant du X-α-Gal. Les clones positifs pour tous les marqueurs sont repiqués sur des boîtes SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade fraîches et conservés à 4°C, ce sont les boîtes mères

III.5.5 Transformation de levures à l'acétate de lithium

Plusieurs colonies de la souche mère AH109 ou Y187 sont suspendues dans 1 ml de YPDA (20 g/L Difco peptone, 10 g/L Yeast extract, 2% dextrose, 0,003% adénine) en vortexant 5 min, puis sont transférées dans 50 ml de milieu YPDA, incubées 16h à 30°C sous agitation (250 rpm). La culture, en phase stationnaire ($DO_{600nm} > 1.5$), est diluée dans 300 ml de YPDA de façon à atteindre une DO_{600nm} de 0,2-0,3, puis incubée 3h à 30°C sous agitation (230 rpm). Quand la DO_{600nm} est comprise entre 0,4 et 0,6, la culture est centrifugée 5 min à 1000g et le culot est vigoureusement resuspendu dans 50 ml de TE. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 100g, les levures sont remises en suspension dans 1,5 ml de TE/LiAc 1X (100 mM acétate de lithium, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). 100 µl de cette suspension sont ajoutés à un mélange de 0,1 µg de l'ADN à transformer et de 100 µg d'ADN de sperme de hareng, puis 600 µl de solution PEG/LiAc (40% PEG, 100 mM acétate de lithium) sont additionnés. L'ensemble est vigoureusement resuspendu, puis incubé 30 min à 30°C sous agitation (200 rpm). 70 µl de DMSO sont ajoutés à la suspension, qui est ensuite soumise à un choc thermique (15 min à 42°C puis 2 min sur glace). Les levures sont récupérées par centrifugation 5 sec à 14000 rpm, remises en suspension dans 100 µl de TE, et étalées sur boîtes SD de sélection.

III.6 Caractérisation d'interactions protéine-protéine *in vitro*

III.6.1 Transcription et traduction *in vitro* en présence de [³⁵S]Méthionine

Le kit TNT Quick reaction (Promega) a été utilisé pour les réactions de transcription et traduction couplées *in vitro*. Tous les constituants du kit sont conservés sur glace. 1 µg de l'ADN codant la protéine d'intérêt est mélangé à 40 µl de TNT Quick Master Mix (composition exacte non fournie par le fabricant) et 2 µl de [³⁵S]Méthionine (1000 Ci/mmol et 10 mCi/ml) dans un volume final de 50 µl. L'ensemble est incubé 90 min à 30°C. Pour vérifier la taille des protéines produites, 5 µl de l'échantillon sont ensuite mélangés à du tampon de charge, chauffés 5 min à 95°C et déposés sur gel SDS-PAGE (voir protocole de western blot). Après migration, les protéines sont fixées 30 min à température ambiante dans du tampon de fixation (10% acide acétique glacial, 50% méthanol). Le gel est lavé, incubé 5 min dans une solution à 10% glycérol et mis en présence d'une solution amplifiant le signal (Amplify, Amersham) pendant 15 min. Il est ensuite séché, et mis à exposer contre un film autoradiographique (Kodak) de 24h à plusieurs jours

III.6.2 Surproduction de la protéine *ii_{86/88}ARFP* en bactérie

Une préculture de bactéries BL21 transformées par le plasmide pIV1348 exprimant *ii_{86/88}ARFP* en fusion à la GST est diluée dans 500 ml de milieu LB liquide à 100 µg/ml d'ampicilline, puis incubée à 20°C pendant 6h. L'expression de protéines recombinantes est ensuite induite avec 0,1 mM d'IPTG pendant 90 min à 20°C. Après centrifugation 10 min à 6000g, le culot est repris dans 45 ml de PBS additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules sont lysées par 7 cycles de sonication de 3 min (intensité 7, pulse 30%), puis centrifugées 10 min à 15000 g. Le surnageant est mis en présence de billes de glutathione-sépharose 4B (Amersham). Ces billes sont constituées d'une matrice de sépharose 4B couplée à la Glutathione qui est un ligand de la GST. Avant utilisation, 700 µl de suspension de matrice sont centrifugés 5 min à 500 g, lavés avec 10 volumes de PBS froid, recentrifugés et repris dans 500 µl de PBS. L'incubation du surnageant avec 500 µl de billes de sépharose se fait pendant 1h à 4°C sous agitation douce. Les billes sont ensuite lavées 3 fois au PBS, et resuspendues dans 500 µl de PBS-1% Triton.

III.6.3 Précipitation par GST pull-down

50 µl des billes de glutathione sépharose couplées à la protéine de fusion à la GST sont saturés avec de la BSA (concentration finale 1 mg/ml) 15 min à température ambiante. Puis, ces billes sont incubées 2h avec 10 µl de protéine traduite in vitro en présence de [³⁵S]Méthionine dans du tampon EBC (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, pH8) Vf=200µl. Après incubation, le mélange est centrifugé 30 sec à 500 g, et les billes sont lavées 3 fois dans 600 µl de tampon EBC. Finalement, les billes sont reprises dans 30 µl de tampon de charge, chauffées 5 min à 95°C et déposées sur gel SDS-PAGE (voir protocole de western blot). Après migration, le gel est traité comme en VIII.2.

D. ETUDE DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION DE LA PROTEINE ARFP DU VHC

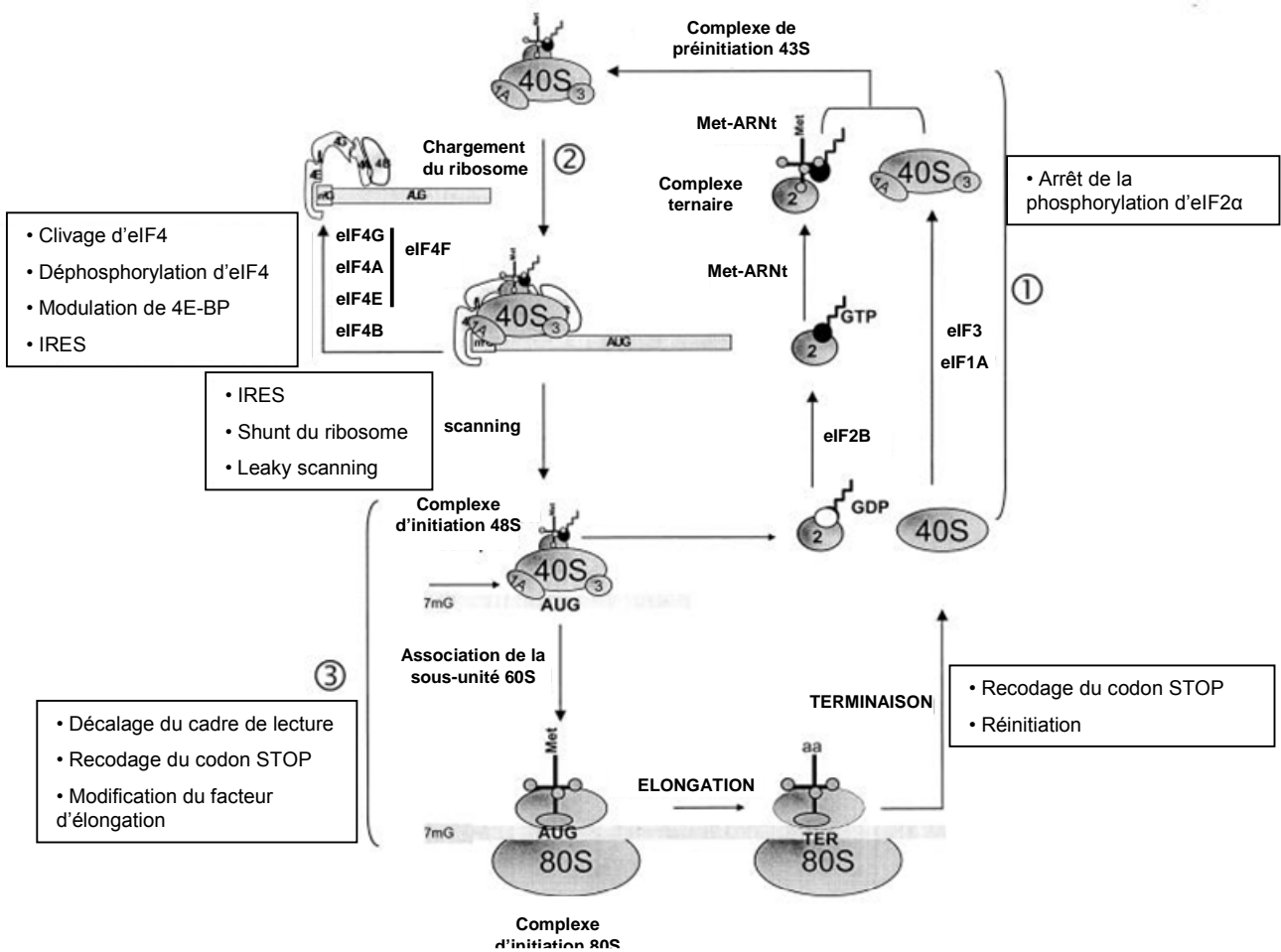


Figure 38. Représentation schématique de la traduction d'un ARNm eucaryote et sites principaux de l'action des virus (d'après Gale *et al*, 2000). La première étape est la formation du complexe de préinitiation, qui va ensuite s'assembler sur la coiffe de l'ARNm. La recherche du codon d'initiation (scanning) constitue la 2^e étape. Après positionnement de la sous-unité 40S sur le codon AUG, eIF2-GDP est recyclé et la sous-unité 60S peut se joindre au complexe. La traduction s'achève à la rencontre d'un codon stop. Les sites majeurs d'action des virus sont indiqués à côté de chaque étape en encadré. Dans un souci de simplification, l'extrémité 3' de l'ARNm et le modèle closed-loop ne sont pas représentés.

I. Mécanismes de traduction dans la cellule eucaryote

Par opposition aux bactéries, les eucaryotes possèdent plusieurs mécanismes d'initiation de la traduction de leurs protéines. Par rapport à l'initiation coiffe-dépendante qui est majoritaire, la réinitiation et l'initiation interne sont deux mécanismes nettement moins efficaces. La traduction peut être divisée en quatre étapes (**Fig. 38**) : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage. L'initiation regroupe les événements permettant l'assemblage du ribosome sur l'ARNm au niveau du codon d'initiation, avec un ARNt méthionine initiateur ($\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$) fixé dans son site peptidyl (P). Lors de l'élongation, les ARNt portant chacun un acide aminé ($\text{aa-ARNt}^{\text{aa}}$) se placent au niveau du site accepteur (A) du ribosome. Si l' $\text{aa-ARNt}^{\text{aa}}$ correct est placé en face de son codon accepteur sur l'ARNm, le ribosome catalyse la formation d'une liaison peptidique entre l'aa porté par l'ARNt et l'aa précédent. Après translocation de l'ARNm et de l'ARNt, le codon suivant est placé dans le site A du ribosome et le processus se répète. La terminaison se produit à la rencontre d'un codon stop et la protéine synthétisée est relarguée. Finalement, les sous-unités du ribosome se dissocient, libérant l'ARNm et permettant une nouvelle initiation sur cette molécule (Kapp and Lorsch 2004).

En plus de ce schéma général, des mécanismes particuliers sont utilisés pour exprimer des génomes polycistroniques chevauchants ou non. C'est notamment le cas de virus qui ont trouvé un moyen de compacter au maximum leur information génétique afin d'exprimer plusieurs protéines à partir d'un génome de taille limitée. Les virus dépendent tout ou en partie de la machinerie cellulaire, leur capacité génomique limitée ne leur permettant pas de coder toutes les protéines nécessaires à la traduction. Les virus infectant des cellules eucaryotes exploitent cette machinerie cellulaire pour détourner les facteurs de traduction à leur profit et contrôler l'expression de leurs gènes (Gale *et al.* 2000). Cette dernière caractéristique est vitale pour les virus à ARN, notamment les virus à ARN de polarité positive dont la traduction du génome est la première étape de la synthèse de nouveau virus. Cette stratégie est appelée programmation traductionnelle et repose sur l'utilisation des uORFs (upstream open reading frames) régulatrices, des cadres de lectures chevauchants, des transcrits multicistroniques et des contrôles de terminaison de la traduction pour permettre à

ces virus une utilisation optimale de leur génome. Dans la plupart des cas, la reprogrammation traductionnelle est dictée par la structure même de l'ARN viral codant.

D'autres exemples de reprogrammation traductionnelle existent chez les eucaryotes, ces mécanismes sont souvent proches d'erreurs de traduction (pour revue voir Gale et Foy, 2005). Ainsi, au cours de l'élongation de la traduction eucaryote, il y a trois types possibles de mécanismes : d'une part les erreurs non-sens, qui conduisent à la substitution d'un aa par un autre avec comme cas particulier la lecture d'un codon stop (« readthrough ») et d'autre part les erreurs de processivité qui provoquent soit un arrêt précoce de la synthèse soit la traduction d'une phase de lecture alternative. L'arrêt précoce de la traduction est de loin le phénomène le plus répandu et est provoqué par un mécanisme d'édition du ribosome dans lequel l'aa-ARNt^{aa} se dissocie spontanément du ribosome (« drop-off »). Dans le modèle actuellement admis, cette dissociation est la conséquence de l'appariement d'un mauvais aa-ARNt^{aa} qui interagit faiblement avec l'ARNm et se détache du site P du ribosome, ce qui conduit à l'arrêt de la traduction. Le 3^e mécanisme, le décalage de cadre de lecture (« frameshifting ») est dû à un ralentissement du ribosome, en général en raison de la présence d'une structure qui conduit à la traduction d'un cadre de lecture situé dans une autre phase jusqu'à la rencontre d'un codon stop. Les erreurs de décalage de cadre de lecture sont peu fréquentes, de l'ordre de 10⁻⁵ par codon,

1.1 La traduction coiffe-dépendante

Les ARNm matures possèdent une coiffe 7-méthyl-guanine au niveau de leur extrémité 5' et une séquence polyA au niveau de leur extrémité 3'. La coiffe permet l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme, augmente leur stabilité et l'efficacité de la traduction, et joue un rôle dans l'épissage. La séquence polyadénylée en 3' de l'ARNm, fortement impliquée dans la stabilité des ARNm, intervient également pour le passage de l'ARNm dans le cytoplasme. Ces deux extrémités vont être reconnues par des facteurs canoniques d'initiation de la traduction.

Les virus peuvent agir à différents niveaux de ce mécanisme afin de détourner la machinerie de traduction cellulaire. Certains exemples présentés en **figure 38** seront donnés dans la suite du texte.

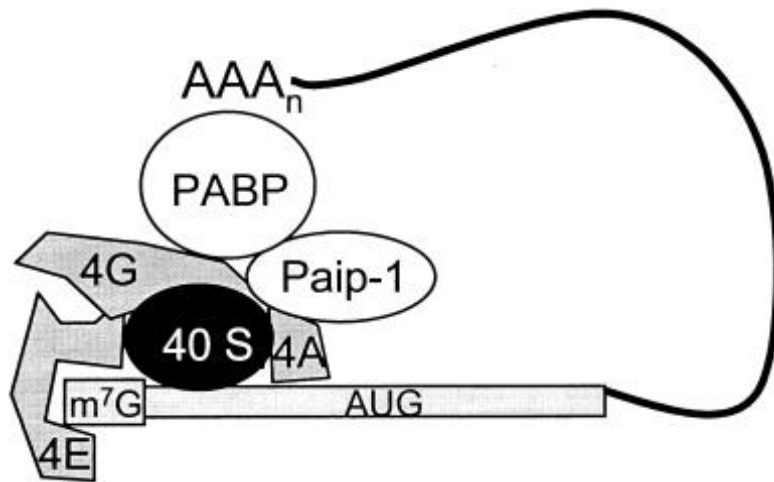


Figure 39. Modèle « closed-loop » de la traduction d'un ARNm (d'après Gale *et al*, 2000). L'ARNm lié au complexe d'initiation eIF4F (formé de eIF4A, eIF4E et eIF4G) interagit avec l'extrémité 3' de l'ARNm via PABP. PABP interagit avec l'ARNm par la séquence polyadénylée de l'extrémité 3', et avec la coiffe directement via eIF4G ou indirectement via une interaction avec Paip-1 via eIF4G et eIF4A. Cet assemblage sous forme « closed-loop » (boucle fermée) semble stabiliser l'interaction de la sous-unité 40S avec l'ARNm.

1.1.1 Le modèle closed-loop

Dans le modèle « closed-loop », la coiffe et l'extrémité polyA de l'ARNm sont rapprochées l'une de l'autre par l'intermédiaire de protéines se fixant à la séquence polyA (PABP) (**Fig. 39**). Les protéines PABP interagissent également avec des éléments du complexe de reconnaissance de la coiffe : eIF4G et Paip-1 (PABP-interacting protein 1) (Craig *et al.* 1998). Paip-1 interagit avec eIF4G et l'hélicase eIF4A (Lindquist and Petersen 1990). Ainsi, l'ARNm se replie et rapproche ses extrémités 5' et 3', dans une structure comparable aux génomes circulaires. Cette structure est impliquée dans la stabilité de l'ARNm et du complexe de la coiffe et permet le recrutement et le recyclage des sous-unités du ribosome dans le souci d'une traduction plus efficace (Jacobson 1996).

1.1.2 L'initiation coiffe-dépendante

La traduction coiffe dépendante est le mode de traduction de la grande majorité (95-97%) des ARNm de la cellule. Elle permet la régulation de l'expression des protéines de la cellule, notamment en modulant l'assemblage des composants de la coiffe en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'assemblage du complexe ternaire eIF2·GTP·Met-ARNt_i^{Met} avec la sous-unité 40S du ribosome, cette liaison étant facilitée par les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 (**Fig. 38**). Le complexe résultant est appelé 43S. En parallèle, le complexe eIF4F (composé de eIF4A, E et G) se fixe via eIF4E. Les structures secondaires d'ARN présentes dans la région 5' de l'ARNm sont ouvertes par l'action ATP-dépendante de eIF4A et les propriétés de liaison à l'ARN de eIF4B et eIF4H. L'interaction entre eIF4F, eIF3 et la protéine de liaison à la séquence poly(A) (PAB) fixée à l'extrémité 3' de l'ARNm permet ensuite de charger le complexe 43S sur l'ARNm. Le complexe 43S commence alors à lire la région leader de 5' vers 3' à la recherche du codon d'initiation. Ce processus, appelé scanning, implique l'hydrolyse d'ATP et probablement eIF1 et eIF1A. Le codon initiateur est généralement le premier AUG ou alors un AUG suivant situé dans un contexte optimal (défini par la séquence de Kozak). Quand ce codon est identifié, il est reconnu par l'anticodon porté par l'ARNt initiateur, et ils s'apparient. eIF1 semble impliqué dans cette reconnaissance. Cette étape est catalysée par l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 grâce à l'activité GTPase de eIF5. Puis, après hydrolyse, la forme eIF2·GDP transfère le complexe Met-ARNt_i^{Met} dans le site P de la sous-unité 40S et se dissocie du complexe. Il semblerait qu'à cette étape les facteurs eIF 1, 1A, 3 et 5 soient également libérés. On ne sait pas si la fixation de eIF5 au complexe intervient avant ou après l'étape d'hydrolyse, mais ce facteur facilite la liaison de la sous-

unité 60S au complexe 40S·Met-ARNt_i^{Met}·ARNm, ce qui entraîne l'hydrolyse du GTP lié à eIF5 et sa dissociation du complexe. Cette étape est probablement la dernière de l'initiation de la traduction.

De nombreux facteurs cellulaires canoniques sont impliqués dans l'initiation de la traduction, et l'ordre dans lequel ils interviennent est encore discuté. Parmi eux eIF3 joue un rôle central puisqu'il peut se fixer à la fois à la sous unité 40S et interagir avec d'autres facteurs eIFs. *In vivo*, il existe un complexe multifactoriel composé d'au moins eIF1,2,3,5 et un ARNt_i^{Met} stable, son intégrité étant importante pour l'étape d'initiation.

1.1.3 Le modèle scanning

Plusieurs zones d'ombres persistent dans ce scénario. Lors du scanning, l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP peut être soit utilisée par eIF4A pour transloquer le ribosome, soit pour défaire les structures de l'ARN. Il a été suggéré que le complexe 43S peut atteindre l'AUG en absence d'ATP et de eIF4 si la région 5'NTR de l'ARNm n'est pas très structurée (Pestova and Kolupaeva 2002). Par ailleurs, la reconnaissance de l'AUG est dépendante de la séquence environnante. Le premier AUG rencontré lors du scanning peut être ignoré si le contexte d'un AUG situé en aval est plus favorable (Kozak 1986). La régulation de ce mécanisme demeure mystérieuse, et le contexte le plus favorable chez les mammifères est la séquence GCCRCCAAUGG (Kozak 2002) et AACAAAUGGC chez les plantes (Futterer *et al.* 1996). Une purine en position -3 est le résidu fonctionnellement le plus important. De nombreuses études ont essayé de rapprocher ce phénomène du système Shine-Dalgarno/ARN 16S bactérien, mais la séquence Kozak semble fonctionner différemment. eIF1 serait impliqué dans la reconnaissance de l'AUG en déstabilisant les complexes d'initiation positionnés sur des AUG non favorables. Le scanning peut être moins strict (« leaky scanning »), et un AUG peut être reconnu par le complexe de préinitiation et diriger une traduction minoritaire, mais dans la majorité des cas le scanning continuera jusqu'au codon optimisé (Kozak 1986).

Le mécanisme de scanning est également possible avec des ARN non coiffés ou portant une coiffe non méthylée (Gppp- ou Appp-). Dans ce cas, le codon initiateur préférentiellement choisi est celui situé en premier en 5' et ce choix implique la participation au moins en partie du complexe eIF4F (Pause *et al.* 1994). Cependant, la traduction de ces ARNm est beaucoup moins efficace.

sont centrifugées 5 min à 6000 g et les culots sont repris dans 200 µl de tampon de charge pour protéines. 20 µl sont chauffés 5 min à 95°C et déposés sur gel SDS-PAGE (voir III.3). Après migration, le gel placé dans une solution fixant et colorant les protéines (2% bleu de Coomassie, 50% éthanol, 10% acide acétique) pendant 30 min, et lavé dans une solution de décoloration (25% éthanol, 10% acide acétique) jusqu'à élimination du bruit de fond. Le clone exprimant en grande quantité la protéine de fusion est sélectionné et sera utilisé pour les expériences de surproduction (voir III.5.2).

III.2 Transfection de cellules eucaryotes

Les cellules sont ensemencées la veille de la transfection à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules par boîte de 6 cm de diamètre.

III.2.1 Phosphate de calcium

Cette méthode est utilisée pour transférer les cellules HEK293. 7,5 µg d'ADN plasmidique est mélangé avec 31 µl de CaCl_2 2M le volume est ensuite ajusté à 250 µl avec de l'eau stérile. Ce mélange est ajouté goutte à goutte à 250 µl de tampon HBS 2X (HEPES 50 mM pH 7,1, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM). Après une incubation de 30 min à température ambiante, l'ADN ainsi précipité est mis au contact des cellules préalablement lavées au PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,47 mM). Après 20 heures d'incubation à 37°C, le précipité est lavé deux fois au PBS puis les cellules sont incubées pendant 24h en présence de milieu frais.

III.2.2 Lipofectamine

Les cellules Huh-7 sont difficiles à transférer par la méthode précédente. Nous avons donc choisi un protocole utilisant la lipofectamine Plus (Invitrogen). La lipofectamine est dépourvue de toxicité et permet d'obtenir des efficacités de transfection de l'ordre de 30% pour ce type cellulaire. Il s'agit d'une technique de transfert de gènes basée sur l'utilisation de liposomes cationiques. L'ADN n'est pas inclus dans les liposomes mais est attiré par ses charges négatives à la surface des lipides chargés positivement. Les cellules sont préalablement lavées et incubées dans du milieu optiMEM (Invitrogen), un milieu synthétique sans sérum car le sérum inhibe l'effet de la lipofectamine. 10µl de lipofectamine et 100µl d'optiMEM sont

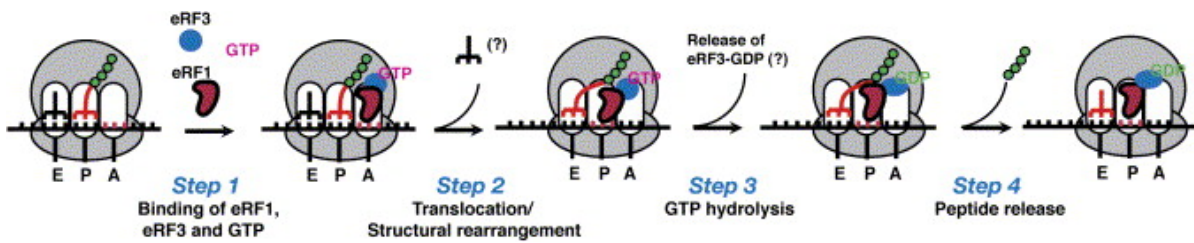


Figure 40. Modèle de terminaison de la traduction chez les eucaryotes (d'après Alkalaeva *et al*, 2006). L'étape 1 consiste à la fixation de eRF1, eRF3 et du GTP sur le complexe de pré-terminaison. Dans un deuxième temps, un réarrangement permet la translocation de la chaîne peptidique au site E, avec hydrolyse du GTP, de la liaison peptide-ARNt et le relargage du peptide synthétisé.

1.1.4 L'élongation et la terminaison

Une fois que l'AUG initiateur a été reconnu et choisi, l'ARNm est traduit de 5' en 3' par plusieurs complexes 80S à la fois, chaque ribosome portant une chaîne peptidique en élongation. Avant d'être intégré dans une chaîne peptidique, l'aa-ARNt^{aa} va être reconnu par le facteur d'élongation eucaryote eEF1A auquel est fixé du GTP. C'est sous cette forme que la reconnaissance codon-anticodon de l'aa-ARNt^{aa} a lieu dans le site A du ribosome et entraîne la formation d'une liaison peptidique entre l'aa porté par cet ARNt et l'aa précédent. Ceci est possible par hydrolyse du GTP de eEF1A. eEF1A est ensuite relargué, et le facteur eEF2 couplé à une nouvelle molécule de GTP va permettre la translocation de l'ARNm et de l'ARNt portant la chaîne peptidique en élongation dans le site P. Le codon suivant à décoder est placé dans le site A du ribosome et un autre cycle peut alors commencer.

L'étape finale de la synthèse protéique est l'hydrolyse de la liaison peptidique de l'ARNt et le relargage du polypeptide néosynthétisé (**Fig. 40**). Ceci est provoqué par la rencontre d'un codon de terminaison (UAA, UGA, ou UAG) par le site A du ribosome. L'hydrolyse de la liaison ester entre le polypeptide et l'ARNt a lieu dans la grande sous-unité du ribosome au niveau du centre peptidyl transférase (PTC), et dépend du facteur de relargage eucaryote de classe 1 (eRF1) (Kisselev *et al.* 2003). eRF1 reconnaît les codons de terminaison au niveau du site A de la sous-unité 40S et permet le relargage par le PTC de la sous-unité 60S par un mécanisme encore inconnu. eRF1 est composé de trois domaines portant chacun une fonction différente : le domaine N qui reconnaît le codon stop (Kolosov *et al.* 2005), le domaine M qui conduit à l'hydrolyse de la liaison peptide-ARNt (Song *et al.* 2000) et le domaine C qui permet l'interaction de eRF1 avec les facteurs de relargage de classe 2 eRF3a et eRF3b. eRF3 possède une activité GTPase mais son rôle reste mal connu. Un modèle propose la liaison de eRF1, eRF3 et du GTP quand le codon stop est dans le site A du ribosome, déplaçant l'ARNt lié à la chaîne peptidique dans le site E du ribosome, conduisant à l'hydrolyse du GTP suivie de l'hydrolyse de la liaison peptide-ARNt, et donc le relargage du peptide (Alkalaeva *et al.* 2006).

1.2 Le leaky scanning

Lors de la traduction, l'initiation de la traduction peut avoir lieu de façon peu efficace sur le premier AUG rencontré indépendamment du contexte Kozak et conduire à la synthèse d'une protéine minoritaire. Dans ce cas, le scanning peut continuer en parallèle à la recherche

d'un AUG plus fort qui sera majoritairement choisi pour initier la traduction (Kozak 2002). Ce mécanisme de sélection d'un AUG situé en aval est appelé « leaky scanning » ou fuite de scanning, et permet la traduction de plusieurs gènes dans des proportions différentes à partir d'un seul ARN.

L'initiation de la traduction par leaky scanning est utilisée par de nombreux virus, notamment les rétrovirus. Par exemple, dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine acquise (VIH), de nombreux ARNm multicistroniques sont produits parmi lesquels un ARNm bicistronique portant les cadres ouverts de lecture (ORF) codant Vpu et Env. Ces ORF sont organisées en tandem, avec Vpu en amont d'Env. Env, qui est la protéine d'enveloppe, est nécessaire en grande quantité dans le cycle viral. Lors de la traduction, l'AUG de Vpu qui n'est pas situé dans un contexte optimal sera reconnu par quelques ribosomes, la grande majorité choisissant l'AUG d'Env qui est plus fort. La protéine Env est donc produite en grande quantité par un mécanisme de leaky scanning qui implique une synthèse faible de Vpu. Dans le cas du VIH, le leaky scanning est à l'origine d'un équilibre entre Vpu et Env avec une efficacité de traduction de Vpu de quelques pourcents de la traduction de Env (Schwartz *et al.* 1990). Ce système garantit une expression constante et forte de Env, et constante et faible de Vpu, permettant l'accumulation dans des quantités adaptées de ces protéines pour les phases tardives de l'infection.

1.3 La réinitiation

Lorsque l'AUG initiateur est suivi d'un court ORF de 20-30 aa, un mécanisme de scanning et de réinitiation à un site situé en aval est possible (Kozak 1987). Dans le même esprit, on admet que dans un ARNm eucaryote qui comporte deux ORF longues, il n'y a pas traduction de l'ORF située en aval. Le paramètre décisif pourrait être le temps mis pour la traduction de la 1^{ère} ORF, ou la présence d'une structure de type pseudo-nœud qui pourrait faire pauser le ribosome et empêcher la réinitiation (Kozak 2001)

Alors que dans le cas des ARNm eucaryotes la réinitiation n'est pas possible après traduction d'une ORF longue, quelques exemples ont été décrits chez les virus. Le plus connu est l'ARN subgénomique des calicivirus. Cet ARN possède une ORF en 5' qui code une protéine majoritaire de 75 kDa, la protéine de capsid, et une ORF plus en aval codant une protéine de 10 kDa, synthétisée dans un rapport 1/15. Ces deux ORFS sont chevauchantes sur 4 à 8 nt selon le virus considéré et la traduction de l'ORF2 ne peut se faire que quand la

traduction de l'ORF1 est achevée (Meyers 2003). Il s'agit donc d'un mécanisme de terminaison-réinitiation. Dans ce cas précis, eIF3 est impliqué. C'est ce facteur qui permet à la sous-unité 40S du ribosome de rester fixée sur l'ARN dans la conformation lui permettant de réinitier la traduction sans apport de eIF4G et/ou 4A.

1.4 L'initiation interne

De nombreux cas de synthèse de protéine ne peuvent pas être expliqués par un mécanisme de scanning ou de réinitiation, notamment chez les virus. Par exemple, les ARNs des picornavirus possèdent de très nombreux AUG dans leur région 5' non traduite qui ne sont pas lus comme des codons d'initiation. L'insertion de ces séquences non traduites entre les deux cistrons d'une construction bicistronique a permis de démontrer qu'une séquence virale peut être responsable du placement direct d'un ribosome au niveau d'un AUG interne à la séquence et de l'initiation à partir de ce codon (Pelletier and Sonenberg 1988). Ce site d'entrée interne du ribosome ou IRES dirige un mécanisme qui est maintenant communément admis dans le monde des virus. L'existence de tels mécanismes dans les ARNm eucaryotes est documentée mais actuellement controversée (Komar and Hatzoglou 2005; Kozak 2005)

Dans le cas le plus simple des **dicistrovirus**, comme les virus de la paralysie du criquet (CrPV), l'initiation de la traduction de la protéine de capsid ne nécessite pas les facteurs canoniques d'initiation ni le complexe ternaire eIF2·GTP·Met-ARNt_i^{Met}, mais une région intergénique de 180 nt (Sasaki and Nakashima 1999). Cette région est un IRES composé de 3 pseudo-nœuds, les deux premiers liant la sous-unité 40S et le 3^e occupant le site P de 40S, mimant l'interaction codon-anticodon (Spahn *et al.* 2004). Dans ce cas, l'identité du codon n'est pas importante car l'appariement est conservé. Le premier aa de la protéine est spécifié par le codon suivant positionné dans le site P, et l'ARNt aminoacylé suivant est apporté au site A du ribosome par le facteur eIF1A puis transféré classiquement au site P et l'élongation commence (Wilson *et al.* 2000). Cet exemple n'est pas universellement applicable aux IRES de virus, mais indique l'importance de l'occupation du site P du ribosome pour l'initiation interne.

Les IRES du VHC ou des pestivirus sont bien plus complexes. L'initiation médiée par ces IRES permet également la fixation de la sous-unité 40S sans aucun facteur canonique, et ne nécessite ni le facteur eIF4 ni l'hydrolyse d'ATP. Ces caractéristiques sont proches de l'initiation de la traduction chez les procaryotes, qui nécessite une structure particulière Shine-

Dalgarno mais aucune activité hélicase pour ouvrir les structures secondaires de la séquence et libérer le codon d'initiation. Chez les **picornavirus**, les IRES sont encore plus complexes. C'est cette famille, à laquelle appartient le virus de l'hépatite A, qui a permis de classer les IRES en deux catégories. La classe I est composée des rhino- et entérovirus et la classe II comprend les aphto- et les cardiovirus. Chaque classe possède une forte conservation de séquence et de structure secondaire, mais la seule caractéristique comparable entre les deux classes est la présence d'une région riche en polypyrimidine en 3' de l'IRES (Jackson and Kaminski 1995). Le plus décrit des IRES est celui du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) qui appartient à la classe II. Dans le cas de l'EMCV, l'AUG initiateur est reconnu spécifiquement alors qu'un autre AUG situé juste 8 nt en amont est ignoré. La distance entre l'AUG et l'extrémité 3' de l'IRES semble importante pour cette reconnaissance (Kaminski *et al.* 1994). Chez les picornavirus de classe I comme le poliovirus, un AUG est systématiquement situé à environ 25 nt d'une région riche en polypyrimidine mais ne dirige pas l'initiation. Le vrai codon initiateur est invariablement l'AUG suivant. Le modèle le plus probable est une reconnaissance du premier AUG par la sous-unité 40S, puis un transfert à l'AUG suivant. On ne sait pas si cela a lieu via scanning du ribosome ou par un mécanisme de « shunting » du ribosome. Un tel mécanisme se produit chez le FMDV (foot-and-mouth disease virus) qui possède un IRES de type II et deux sites d'initiation. La sous-unité 40S est d'abord positionnée sur le premier AUG où une traduction minoritaire est initiée, alors que la majorité des ribosomes atteignent le second AUG par scanning (Belsham 1992).

1.5 Le détournement (« shunt ») du ribosome

Ce mécanisme combine l'initiation coiffe-dépendante, le scanning et l'initiation interne, pour éviter à la sous-unité 40S le scanning d'une séquence de structure complexe située en amont d'un cadre ouvert de lecture. Le « shunt » du ribosome est basé sur l'utilisation de la coiffe et du complexe protéique lié à la coiffe pour se fixer à l'ARNm. Les ribosomes commencent le scanning au niveau de la coiffe, puis évitent de grandes parties de la région 5' non traduite, ce qui préserve sa structure. Les exemples les plus connus de détournement du ribosome sont le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et l'adénovirus (Yueh and Schneider 1996; Schmidt-Puchta *et al.* 1997).

Dans le cas du **CaMV**, l'ARN monocistronique 35S contient plusieurs uORF (ORF en aval ou upstream ORF) dans la région leader, une tige-boucle puis un ORF majoritaire qui ne

devrait pas être traduit dans le modèle du scanning. Le modèle actuellement proposé est une initiation de la traduction sur la première uORF avec association du complexe 80S sur l'ARN 35S puis, à la fin de l'uORF, un transfert de la sous-unité 40S au niveau d'un site situé en aval de la tige-boucle avec reprise du scanning jusqu'à l'AUG de l'ORF principale (Pooggin *et al.* 2000). Dans ce cas, il s'agit d'un mécanisme particulier de réinitiation.

Le rôle du shunt du ribosome a été bien décrit dans le cas des protéines tardives de l'**adénovirus**. Ces dernières sont codées par un ARN dont la région leader est tripartite, composée d'une région linéaire puis de 2 régions structurées très stables. Dans la première phase de l'infection, cet ARN est traduit à la fois de façon coiffe-dépendante et par shunt du ribosome, alors que lors de la phase tardive seul le shunt est utilisé. Ceci peut être expliqué par la déphosphorylation de eIF4E durant l'infection, diminuant de fait le nombre de complexes eIF4F disponibles pour la traduction coiffe-dépendante et donc la traduction des protéines de l'hôte (Huang and Schneider 1991). Ainsi, la manque d'eIF4F permet l'expression des protéines tardives par un mécanisme de shunt du ribosome ce qui ne nécessite pas d'activité hélicase.

1.6 Le recodage de codon («functional recoding ou readthrough»)

Parmi les mécanismes de traduction alternatifs utilisés par les virus, on trouve le recodage de codon. Ce phénomène survient lorsqu'un ribosome rencontre un codon stop et le lit comme un codon codant au lieu de provoquer la terminaison de la traduction. Ceci a été largement documenté dans le cas du **virus Moloney de la leucémie murine** (Mo-MuLV). Dans ce cas, un codon stop est placé à la jonction entre les protéines Gag et Pol. Un recodage conduit à la synthèse d'une polyprotéine Gag-Pol dans 5% des cas et cette fréquence est très importante pour la répllication (Yoshinaka *et al.* 1985). Ce mécanisme dépend d'un pseudo-nœud situé en 3' du génome. Le recodage de codon permettrait au virus de réguler l'expression de la polyprotéine Gag-Pol pendant l'infection.

Plus généralement, le recodage est utilisé par de nombreux virus à ARN simple brin de polarité positive (Beier and Grimm 2001). Les ARNt suppresseurs qui permettent le recodage des codons stop sont présents physiologiquement dans la cellule où ils sont utilisés pour la lecture de leurs codons respectifs. Lors de la lecture d'un codon stop par un ARNt suppresseur, on aboutit à un appariement codon-anticodon non conventionnel. La stabilité de cet appariement est dictée par l'affinité de l'ARNt pour le codon stop et par la séquence en 3'

de l'anticodon, ce qui peut moduler la fréquence du recodage. Trois grands types de contextes viraux favorables au recodage ont été décrits sans pour autant élucider les mécanismes exacts aboutissant à sa survenue (pour revue voir Beier et Grimm 2001). L'influence des régions en 3' reste notamment très discutée.

Seul le cas du recodage de codon par l'ARNt sélénocystéine est bien documenté (Hubert *et al.* 1998). La sélénocystéine (Sec) est codée par un codon UGA et son incorporation dans une protéine se fait par la reconnaissance du codon par l'anticodon UCA porté par l'ARNt^{Sec}. Ce décodage est particulier aux ARNm codant des sélénoprotéines, famille qui regroupe toutes les protéines contenant la Sec. Dans ces ARNm, des séquences présentes en *cis* au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNm vont fixer une/des protéines appartenant au complexe *trans* régulateur qui permet l'incorporation de l'ARNt^{Sec} en l'absence des facteurs d'élongation classiques. Il s'agit d'un mécanisme très spécifique à cette famille de protéines, qui leur permet d'incorporer cet acide aminé rare nécessaire à leur fonction (pour revue voir Driscoll et Copeland 2003).

1.7 Le décalage de cadre de lecture (« frameshift »)

Le décalage de cadre de lecture, qui est initialement une erreur de traduction, est utilisé de façon programmée pour exprimer des ORFs chevauchants portant leurs informations génétiques dans des phases de lecture différentes. Ceci implique que lors de la traduction le ribosome doit changer de cadre de lecture en se décalant d'un ou deux nucléotides, aboutissant selon le sens de glissement à un décalage de cadre de lecture de type +1 ou -1. Ces mécanismes sont largement utilisés par les virus.

1.7.1 Glissement de cadre de lecture -1

Le décalage dans le sens -1 par rapport au cadre de lecture initial est retrouvé dans la grande majorité des cas et est de fait le plus documenté. Le modèle communément admis indique que lors de l'élongation, le ribosome est physiquement forcé à faire une pause au niveau du site de décalage par une structure en pseudo-nœud, constituée d'une tige-boucle située de 5 à 9 nucléotides en aval du site de glissement, et sur laquelle se replie une séquence de la partie 3' de l'ARNm (Giedroc *et al.* 2000). Une telle structure est nécessaire mais pas suffisante au décalage de cadre de lecture : si elle permet effectivement une pause de la traduction, c'est l'association de la séquence nucléotidique du site de décalage et du pseudo-

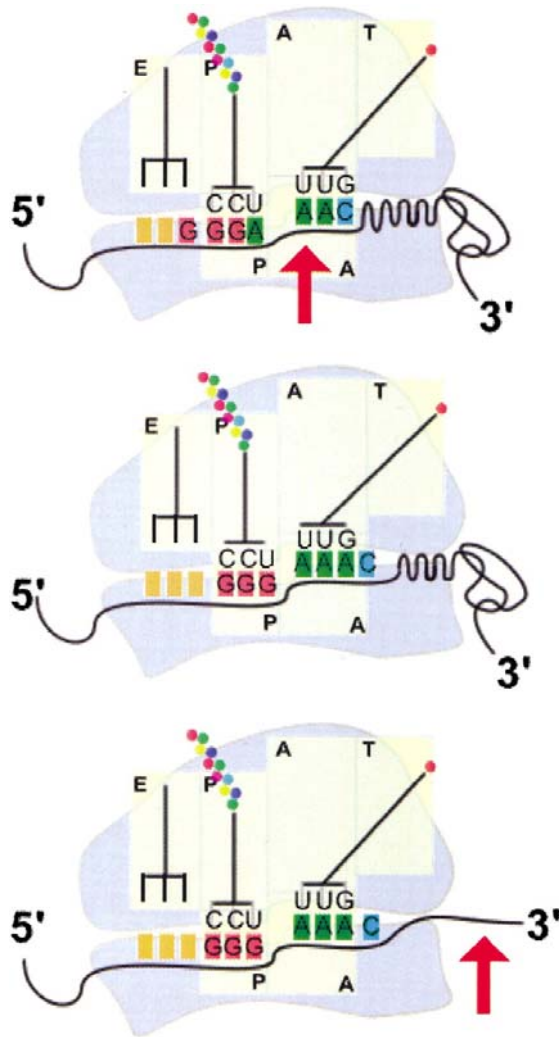


Figure 41. Mécanisme de décalage de cadre de lecture -1 (d'après Plant *et al*, 2003). La présence du pseudonoeud entraîne une pause de la traduction alors que les sites A et P du ribosome sont occupés par des ARNts positionnés sur la séquence heptamérique X XXY YYZ (flèche rouge). Le ribosome glisse d'une base vers 5', les bases non-wobble des ARNts des sites A et P se réappariant avec les codons de la nouvelle phase (bases de même couleur). Finalement, la structure du pseudonoeud est ouverte pour permettre la poursuite de l'élongation.

nœud qui favorise le décalage (Kontos *et al.* 2001). Récemment, une étude par microscopie électronique a mis en évidence une interaction directe entre le pseudo-nœud et le ribosome. Cette interaction bloque l'entrée de l'ARNm dans le canal du ribosome et empêche la translocation de l'ARNt au site P et en faisant certainement intervenir des facteurs cellulaires (Namy *et al.* 2006).

Les sites de glissement du ribosome en -1 sont des séquences heptamériques de type X-XXY-YYN où X et N peuvent être un n'importe quel nucléotide et Y un A ou un U (Brierley *et al.* 1992). Cette séquence va permettre le glissement du ribosome d'une base. Les triplets YYN sont situés initialement au niveau du site A du ribosome et cette configuration de séquence permet aux ARNt des sites A et P, après glissement d'un nucléotide, d'être toujours appariés avec au moins 2 des 3 nucléotides du codon. Ils sont décodés par des ARNts qui portent une base fortement modifiée au niveau de leur anticodon, ce qui peut favoriser le décalage du ribosome (Licznar *et al.* 2003). Une autre hypothèse propose l'implication de la force des interactions codon-anticodon dans la survenue du glissement de cadre de lecture (Baranov *et al.* 2004). Différents modèles ont été proposés pour expliquer la translocation des ARNt du site A à P : dans le modèle intégré, le glissement des deux ARNts s'effectue après l'entrée de l'ARNt-aa dans le site A mais avant le transfert peptidique (Jacks *et al.* 1988) alors que dans le modèle hybride il a lieu après le transfert du peptide avec un positionnement des ARNts sur les sites hybrides E-P et P-A (Weiss *et al.* 1988). De nombreuses études génétiques, biochimiques et thermodynamiques ont montré que les ribosomes ne glissent pas après le transfert peptidique (pour revue voir Plant *et al.* 2003). Le modèle intégré amélioré suggère un glissement -1 après la fixation de l'aa-ARNt^{aa} au ribosome mais avant le transfert du peptide (**Fig. 41**). Il a de plus été observé que la fixation de l'aa-ARNt^{aa} sur le site A s'accompagne d'un mouvement de la boucle anticodon de 9 Å qui permet d'entraîner l'ARNm dans la direction 5', et que la présence du pseudo-nœud s'oppose à ce mouvement (Plant *et al.* 2003). Il y aurait donc deux forces opposées créant une tension locale au niveau de l'heptamère qui pourrait permettre le glissement du ribosome en -1.

Le décalage de cadre de lecture -1 a notamment été intensivement étudié pour le **virus des tumeurs mammaires de la souris** (MMTV). Les gènes *gag*, *pro* et *pol* de ce virus sont chevauchants et les jonctions entre ces gènes sont des sites de décalage de cadre de lecture. L'initiation de la traduction commence classiquement pour *gag* puis, arrivés au niveau du site de décalage, les trois quarts des ribosomes vont continuer la traduction dans le cadre de lecture classique. Le quart restant va poursuivre l'élongation dans la phase -1, aboutissant à la

synthèse d'une polyprotéine Gag-Pro. De même, à la jonction *pro-pol*, moins de 10% des ribosomes vont à nouveau changer de cadre de lecture et permettre la production de la polyprotéine Gag-Pro-Pol (Farabaugh 1996).

1.7.2 Glissement de cadre de lecture +1

Les cas de glissement de cadre de lecture +1 lors de la traduction sont beaucoup plus rares. Comme dans le cas d'un décalage -1, la nature des codons situés dans les sites A et P du ribosome est essentielle au glissement (Baranov *et al.* 2004). La stabilité de l'interaction entre l'aa-ARNt^{aa} et l'ARNm dans le site P est un facteur déterminant pour l'efficacité du décalage de cadre de lecture, les efficacités les plus fortes étant retrouvées quand les interactions codon-anticodon ne sont pas standard (Sundararajan *et al.* 1999). Une corrélation entre l'efficacité du décalage +1 et la stabilité ARNt-ARNm dans le site P après le glissement a été évoquée mais reste discutée dans le système eucaryote (Vimaladithan and Farabaugh 1994). Finalement, la disponibilité des ARNts correspondant aux codons de la phase 0 ou +1 peut modifier la fréquence d'apparition d'un décalage +1 (Pande *et al.* 1995). Ce modèle ne peut toutefois pas être généralisé.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un décalage +1 a été démontré pour le **rétrotransposon Ty1** (pour revue Farabaugh 1996). Les protéines TyA et TyB sont codées par deux séquences chevauchantes, TyB étant uniquement exprimée sous forme TyA-TyB. La séquence de glissement est heptamérique (CUU-AGG-C), mais ne correspond pas au motif retrouvé dans le cas -1. Le glissement est permis par une pause du ribosome lors de la traduction, en attente de l'ARNt^{arg} qui est rare dans la cellule. Le ribosome peut alors se décaler de façon à lire le codon de la phase +1 qui correspond à un ARNt^{gly} qui est beaucoup plus abondant (Belcourt and Farabaugh 1990). En absence de séquence consensus comme c'est le cas lors d'un décalage -1, c'est donc la disponibilité des ARNt^{aa} qui modulerait l'apparition d'un glissement +1.

Les décalages de phase de lecture de type -1 et +1 sont différents : alors que les sites A et P sont occupés lors du glissement -1, le site A est inoccupé lors du glissement +1. Ceci implique des étapes et signaux spécifiques à la survenue d'un de ces deux événements. Le seul exemple nécessitant la présence d'une structure de type pseudo-nœud a été mis en évidence dans le cas des décalages de cadre de lecture +1 est celui de l'ARNm de l'**antizyme** mammifère (Matsufuji *et al.* 1995). Dans ce cas, l'efficacité du glissement est fortement augmentée en présence du pseudo-nœud.

Chez les virus, il ne semble pas exister de mécanisme de décalage de cadre de lecture +1 programmé, destiné à produire de manière naturelle une des protéines virales. Un exemple a toutefois été décrit pour le **virus de l'herpes simplex** (HSV), dont la thymidine kinase virale (TK) codée par le génome confère une sensibilité à l'antiviral acyclovir. Des mutations dans le gène *tk* induisent une résistance à l'acyclovir et permettent au virus de continuer à se propager dans la cellule. Lors de l'étude des formes résistantes, un isolat contenant une mutation d'insertion d'une seule base a été identifié. Cette mutation ne devrait théoriquement permettre que la traduction d'une forme tronquée inactive de TK, alors que l'isolat conserve une activité TK basale et surtout peut être réactivé et exprimer à la fois les formes tronquées et sauvages. Ceci est permis par un décalage de cadre de lecture +1 qui provoque un retour à la phase de lecture d'origine (Hwang *et al.* 2006). Si TK n'est pas nécessaire à la propagation en lignée cellulaire, sa présence est cruciale pour la pathogenèse l'infection HSV en modèle souris. La perte de TK serait alors plus délétère pour le virus que l'avantage apporté par la résistance à l'acyclovir.

II. Mécanismes alternatifs de traduction du VHC : la protéine ARFP

En plus des 10 protéines traduites par le génome du VHC sous forme d'une polyprotéine, l'existence d'une protéine additionnelle appelée ARFP (alternate reading frame protein) a été décrite (Waleswki *et al.*, 2001). Cette protéine est codée par un cadre de lecture chevauchant celui de la protéine core dans la phase +1. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode de synthèse d'ARFP.

Tout d'abord, il a été suggéré que ARFP est produite suite à un événement de décalage de cadre de lecture +1/-2 à proximité du codon 11 de la polyprotéine. Cette observation est basée sur l'existence d'une protéine de 17 kDa traduite *in vitro* à partir de la séquence de core, alors que les poids moléculaires des formes matures et immatures sont respectivement de 21 et 23 kDa. La caractérisation de la forme de 17 kDa a montré qu'elle possède la même partie N-terminale que core sur une dizaine d'aa puis que leurs séquences divergent (Xu *et al.* 2001). Seul un mécanisme de décalage de cadre de lecture pouvait expliquer ce phénomène. Cette hypothèse est étayée par la présence dans la séquence utilisée lors de cette 1^{ère} étude d'une répétition d'adénines (10A) située juste en amont d'une tige-boucle. Ces deux éléments pourraient induire une pause du ribosome, physiquement freiné par la tige-boucle lors de la traduction, entraînant le glissement hors du cadre de lecture normal dans la région riche en A et la poursuite de la traduction dans la phase +1. La séquence riche en A isolée et étudiée hors de son contexte peut diriger la traduction à la fois dans les phases +1 et -1, avec des efficacités comparables (Varaklioti *et al.* 2002; Choi *et al.* 2003). Ceci suggère que d'autres éléments de structure ou l'intervention de facteurs viraux ou cellulaires sont nécessaires pour guider sélectivement la traduction en phase +1. D'autre part, de nombreux codons stop sont présents en aval de la région riche en A dans la phase -1 (**Fig. 36**), indiquant que si la traduction de cette phase existe elle est rapidement abortive.

En 2003, Vassilaki *et al.* ont détecté une traduction en phase +1 à partir de la séquence de core déléetée de son codon d'initiation de la traduction, suggérant l'existence d'un mécanisme alternatif de traduction ne dépendant pas de l'ATG de la polyprotéine. De même, il lui était possible de mesurer une traduction en phase +1 alors que la séquence riche en A est

mutée. Ces auteurs ont montré qu'une traduction efficace peut être initiée au niveau de deux codons d'initiation situés en position 86 et 88 dans la séquence ARF (Vassilaki and Mavromara 2003). Dans ce cas, l'initiation se ferait directement sur ces codons, selon un mode de traduction qui reste à définir mais qui, dans cette étude, n'implique pas l'intervention de l'IRES. Ces codons sont dans un contexte Kozak favorable, ce qui pourrait être important pour expliquer leur reconnaissance.

Une autre étude utilisant une séquence ARF tronquée (56 aa) propose l'existence d'un autre site d'initiation interne au niveau du codon 26 (Baril and Brakier-Gingras 2005). Le codon 26 n'est pas un codon d'initiation classique, mais un GUG ou un GCG selon les variants génétiques. La traduction en phase +1 est largement augmentée par la mutation du codon 26 en ATG, mais drastiquement inhibée en présence d'édéïne même à faibles concentrations. L'édéïne est un inhibiteur de l'initiation Méthionine-dépendante, indiquant que la reconnaissance du codon 26 se fait probablement par l'ARNt_i^{Met} classique. Une initiation ARNt_i^{Met} dépendante minoritaire a déjà été décrite pour les codons qui ne diffèrent que d'un nucléotide du codon AUG comme GUG (Touriol *et al.* 2003). Par contre, il n'existe aucun autre exemple de décodage d'un codon GCG par une ARNt_i^{Met} qui pourrait expliquer cette observation.

Finalement, lors de l'étude du génome du VHC de génotype 1b par surexpression en bactérie, différentes formes de la protéine core ont été analysées. Les différentes formes obtenues résultaient d'un décalage du cadre de lecture +1 au niveau du codon 42, certaines présentant de façon inattendue un rephasage -1 à la fin de la séquence ARF, revenant ainsi dans le cadre de lecture de la protéine core (Boulant *et al.* 2003). L'existence de ces deux phénomènes a ensuite été confirmée dans un contexte cellulaire et *in vitro*. Ces résultats, très différents de ceux observés dans le cas du génotype 1a, suggèrent une spécificité génotypique lors de la synthèse d'ARFP.

Ces modes de traduction particuliers et la difficulté à mettre en évidence cette protéine ont semé le doute sur son existence. Pour beaucoup, ARFP n'est qu'un artefact biochimique et les 10 protéines du VHC traduites via la polyprotéine suffisent largement à expliquer le cycle viral et la pathogénie liée à ce virus. Cependant, des sera de patients réagissent spécifiquement contre cette protéine (Komurian-Pradel *et al.* 2004; Troesch *et al.* 2005) et des cellules T spécifiquement dirigées contre ARFP ont été mises en évidence (Bain *et al.* 2004). Ceci indique que la réponse immunitaire induite par ARFP est spécifique. Si ARFP induit une réponse anticorps c'est qu'elle est effectivement présente lors de l'infection,

mais aucune étude n'a pu démontrer son existence. Les travaux présentés dans ce manuscrit rendent compte de notre souci d'identifier les formes de la protéine ARFP présentes dans le contexte cellulaire, les modes d'initiation de la traduction qui conduisent à leur synthèse ainsi que les mécanismes qui régulent ces différents événements.

HEPATITIS C VIRUS ALTERNATE READING FRAME (ARF) PROTEIN TRANSLATION OCCURS BY INTERNAL INITIATION AND IS SUPPRESSED BY CORE PROTEIN EXPRESSION

Marie Wolf^{1,2}, Thomas F. Baumert^{1,2} and Catherine Schuster^{1,2*}

1 Inserm, U748, Strasbourg, F-67000, France

2 Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000, France

Running title: Translation and Regulation of Hepatitis C Virus Alternate Reading Frame protein

Address correspondence to: Dr. Catherine Schuster, Inserm U748 – Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. Phone: ++ 33 390 243741, Fax: ++ 33 390 243723, E-mail: catherine.schuster@viro-ulp.u-strasbg.fr

The hepatitis C virus (HCV) is a human RNA virus. The genome encodes 10 proteins in a single open reading frame. In the +1 frame, “another reading frame” (ARF) encompassing the core-encoding sequence has been identified encoding the ARF protein (ARFP). Aiming to study the mechanisms of ARF translation leading to initiation of translation in the +1 frame, we defined the viral RNA elements required for ARF translation. Using a panel of chimeric HCV-luciferase reporter constructs derived from infectious HCV isolate H77, we demonstrate that ARFP translation occurs from two sites of internal initiation. Internal initiation was most efficient at codon 86/88 resulting in the synthesis of a truncated ARFP named ii_{86/88}ARFP. No evidence for synthesis of ARFP by frameshifting was observed for prototype H77 isolate used in this study. Interestingly, ii_{86/88}ARFP synthesis was markedly enhanced in constructs containing an inactivated core reading frame. This enhancement was reversed by the co-expression of core in *trans*, suggesting suppression of ARFP synthesis by HCV core. In conclusion, our data indicate that translation of ARFP occurs from two sites of internal initiation of translation and is regulated by HCV core expression. Suppression of ARFP translation by HCV core suggests that ARFP expression is inversely linked to the level of viral replication.

Introduction

More than 170 million people worldwide are currently infected by the hepatitis C virus (HCV). HCV infection represents a major cause of chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma (1). HCV is an enveloped virus belonging to the *Flaviviridae* family and is the unique member of the *hepacivirus* gender. The HCV genome is a single stranded positive RNA of about 9.6 kb. The 5' non translated region (NTR) forms an internal ribosome entry site (IRES) which directs the translation of a precursor polyprotein of about 3000 amino acids. This polyprotein is cleaved co- and post-translationally by cellular and viral proteases resulting in the synthesis of both structural and nonstructural (NS) proteins. The structural proteins core, E1, E2 and p7 are processed by host signal peptidases. The core protein presumably forms the viral nucleocapsid (2), whereas E1 and E2 are the glycoproteins anchored in the virion envelope (3). The NS proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B are essential for replication of the viral genome (4). The 3'NTR is a highly conserved and structured region playing a key role for the initiation and regulation of viral replication.

Besides the polyprotein open reading frame, sequence analyses have shown the existence of another reading frame (ARF) overlapping the core-encoding sequence in the +1 frame (5). Xu et al. have proposed that a 17 kDa protein is encoded by this overlapping reading frame. This protein is named “F” (for frameshift (6)) or “ARFP” (for Another Reading Frame Protein (7)). Previous studies have

suggested that ARFP's synthesis results from a +1/-2 frameshifting event near codon 11, occurring following initiation at the AUG initiator codon of the polyprotein (6). ARFP's existence is supported by a high conservation of its ORF in all genotypes. Furthermore, peptides corresponding to this +1 reading frame react with antiviral antibodies present in the sera from HCV-infected patients suggesting that ARFP is synthesized *in vivo* and its synthesis results in antiviral host immune responses (8, 9). At present time, the function of the ARFP is unknown. Following translation the protein is localized in the endoplasmic reticulum (10, 11).

Programmed frameshifting is quite frequent in viral translation (12), and is used in particular by viruses to express a maximum of information through a limited genome. Several studies (reviewed by Giedroc *et al.*), have mapped an optimal context required to direct a -1/+2 frameshifting event, such as a stuttering sequence formed by redundant runs of bases, coupled with a stem-loop often folded in a pseudoknot conformation (13). In this context, the ribosome is physically paused during the translation by strong RNA-RNA interactions, and slips from its natural reading frame to the overlapping frame. In contrast, mechanisms responsible for +1/-2 frameshifting events are rare and poorly described. Only a few number of proteins are synthesized by this way including secreted antihost proteins of the bacteria *Yersinia pestis* (14), eukaryotic antizyme (15), cryptic cytotoxic T lymphocyte epitopes (16), and mutant herpes virus resistant to acyclovir (17).

The occurrence of a frameshifting event during HCV translation is controversial. First, the sequence used to demonstrate the +1/-2 ribosomal frameshift (6) is not the consensus one, but contains a 10 adenine stretch that could lead to an artificial ribosomal stuttering especially *in vitro* (18). Second, alternative translation mechanisms of the overlapping reading frame have been proposed. These include different sites directing the synthesis of shorter forms of the ARFP. Baril *et al.*, have proposed that codon 26 is recognized by ribosomes as a site of non-AUG initiation of translation (19) in genotype 1a. On the other hand, Vassilaki and Mavromara (20) have shown that translation of the +1 frame can initiate on an AUG codon overlapping codon 86 or 88 of the polyprotein. The relevance of these

mechanisms in translation of functional infectious HCV isolates in hepatoma cells is unknown.

Using infectious prototype HCV clone H77 we mapped the sites of initiation of translation of the core encoding sequence leading to synthesis of ARFP proteins in human hepatoma cells. We demonstrate that ARFP is predominantly synthesized via internal sites of translation in contrast to core which is synthesized via an IRES dependent mechanism. Interestingly, in contrast to previous studies frameshifting was not observed in isolate H77. Furthermore, we demonstrate that ii_{86/88}ARFP is the major translation product of the ARFP reading frame and that its expression is regulated by the core protein.

Material and Methods

Cell culture and transfection. The human hepatoma cell line Huh-7 was kindly provided by Dr. R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) and Human Embryonic Kidney cells (HEK 293) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown and transfected as previously described (21). Medium, fetal calf serum and cell culture additives were purchased from Gibco-BRL.

HCV H77 luciferase reporter constructs. A schematic view of the plasmids is shown in Fig. 1. Nucleotide numbering refers to the HCV-H77 genome sequence (genotype 1a) encoded by p90/HCV FL-long pU (22). This plasmid was used as a template for DNA amplifications. Plasmid pIV1066 was obtained by inserting the luciferase gene of pBI-L (Clontech) in the EcoRI-XbaI sites of a pCIneo plasmid vector (Promega). The first 9 nucleotides (including the ATG) of the luciferase gene were deleted by PCR and the resulting fragment was cloned in the EcoRI-XbaI sites of pCIneo generating pIV1115. For plasmids pIV1116 to 1124, pIV1143 to 1147, pIV1157 to 1166, fragments containing various lengths of HCV core-encoding sequence (in the absence or presence of the 5'NTR) were amplified by PCR using p90/HCV FL-long pU as a template. The amplified fragments obtained were then inserted by ligation into the EcoRI site of pIV1115. pIV1122, pIV1124 and pIV1119 contain 5'NTR and nt342 to nt396 of the core

sequence fused in the 0, +1 and -1 frame to the luciferase gene respectively. pIV1165, pIV1162 and pIV1158 differ from pIV1122, pIV1124 and pIV1119 by the absence of the 5'NTR. The region encompassing nt 342-453 of the core sequence fused in the 0, +1 or -1 frame with the luciferase gene corresponds to pIV1123, pIV1121 and pIV1120 in the presence of the 5'NTR, and pIV1161, pIV1163 and pIV1159 in the absence of the 5'NTR. pIV1117, pIV1118 and pIV1116 contain nt342-630 of core sequence fused in the 0, +1 or -1 frame with the luciferase gene and the 5'NTR sequence respectively, pIV1161, pIV1164 and pIV1160 are the corresponding plasmids without the 5'NTR sequence. pIV1143, pIV1144, pIV1157 enclose the 5'NTR and nt 342-822 of the core sequence fused in the 0, +1 or -1 frame with the luciferase gene, pIV1145, pIV1146 and pIV1147 are the corresponding plasmids in the absence of the 5'NTR. Plasmids pIV1204 and pIV1206 were obtained by a single nucleotide substitution at nt 399 of the HCV (H77) sequence using the QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). This substitution leads to a stop codon in the core sequence (frame 0) (Q₂₀ → TAG) without affecting the ARFP amino acid sequence. Mutagenesis was carried out on pIV1144 and pIV1146 to yield pIV1204, and pIV1206, respectively. Plasmid pIV1203 was generated by site directed mutagenesis at nt 407 of the HCV (H77) sequence in the core-luc pIV1143 plasmid (0 frame fusions), creating a stop codon in the +1 frame (S₂₂ → TGA) amino acid sequence of the core protein. Plasmid pIV1240 results from site-directed mutagenesis at nt 407 of the HCV (H77) sequence carried out on ARFP-luc pIV1144 plasmid (+1 frame fusion). This mutation creates a stop codon in the ARFP sequence (S₂₂ → TGA) but does not change the amino acid sequence of the core protein. For plasmids pIV1242 to pIV1247, a XbaI - Sall restriction fragment encoding the 3'NTR of HCV (nt 9204-9651) was amplified by PCR. This PCR product was added at the 3' end of the luciferase gene in all previous plasmids sequence.

Recombinant adenovirus vectors.

Recombinant adenoviral genomes were generated as infectious plasmids by homologous recombination in *E. coli* as described previously (23). In brief, a DNA fragment encoding the full-length core protein (nt 342 to 914) was obtained by PCR using p90/HCV FL-long pU as

a template, and was inserted into the EcoRI-XbaI sites of the adenoviral shuttle plasmid pTG13337. The resulting vector, pIV1210 was used for homologous recombination with adenoviral sequences of the backbone vector pTG6624 (23) resulting in plasmid pIV1250. Recombinant adenoviruses were synthesized as described recently (4).

Luciferase assay. At 48 h post transfection, cells were washed twice in PBS and lysed in 250 µl Reporter Lysis Buffer (Promega). Luciferase expression was determined by using a TD-20/20 Luminometer (Turner Design). In brief, 5 µl cell lysate were mixed with 25 µl Luciferase Reagent (Promega) and luciferase activity was assessed as described by the manufacturer. Each transfection or infection was performed in triplicate and repeated at least three times. Each set of experiment was normalized to the activity obtained by transfection of a control plasmid encoding the luciferase gene in the absence of the HCV sequence (pIV1066).

Western blot analysis. Huh-7 cells were lysed in Reporter Lysis Buffer (Promega) and centrifuged at 500 x g for 15 s. Supernatants were subjected to SDS-PAGE, transblotted onto Hybond-P membranes (GE Healthcare), and probed with anti-luciferase Mab (Sigma, dilution 1/500 in PBS, 0.1% Tween; 1% skimmed milk) for one hour at room temperature. After extensive washing, an anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma, diluted to 1/5000 in PBS, 0.1% Tween, 1% skimmed milk) was added to the blots for one hour at room temperature. After extensive washing, bound antibodies were detected by chemiluminescence (GE Healthcare).

Results

Mapping of HCV genetic elements required for ARFP synthesis. Since initiation of translation (in particular frameshifting) often requires specific RNA structures, we evaluated the impact of the RNA context on core/ARFP translation efficiency by fusing different stretches of the core coding sequence to a luciferase reporter gene cDNA. Translation efficiency in the three frames (0, +1, -1) was assessed by addition of no, one or two nucleotides between the core and the luciferase sequence, respectively. A second set of similar

plasmids was constructed containing a deletion of the IRES element (Fig. 1). The chimeric HCV-luciferase reporters were transfected in Huh-7 cells. To exclude internal initiation of the luciferase reporter gene, the first 9 nucleotides including the ATG were deleted in all HCV chimeric luciferase constructs. For each plasmid, luciferase activity represented translation of the respective frame.

The core sequence of the HCV(H77) infectious clone contains an adenine rich stretch (AAAGAAAA, nt 364 to 372) proposed to be the slippery signal responsible for the frameshifting event (type A constructs, Fig. 1A). To study the role of this adenine stretch, we determined the translation rates of a coding sequence encompassing nt 342 to 396. Using these HCV-luciferase reporter constructs, translation obtained in the +1 frame accounts for frameshift ARFP (fARFP) synthesis, whereas translation measured in the 0 frame accounts for core synthesis (Fig. 1A). Luciferase activity in the -1 frame represents background and was used as a negative control. In constructs containing the adenine rich stretch, translation ratios in the +1 frame were close to background (Fig. 2, type A). These data demonstrate that the adenine rich sequence is not able to induce a measurable +1/-2 frameshifting event in H77 transfected hepatoma cells. In contrast, synthesis in the 0 frame is very robust in the constructs containing the IRES (pIV1122, 2029 URL Fig. 2A). The results indicate a very efficient IRES initiation of core translation in comparison with the rates measured in the absence of the IRES sequence (pIV1165, 118 URL, Fig. 2B). Thus, despite a very efficient core protein translation, this viral sequence is not able to promote a frameshifting event. These data suggest that structures involved in ARFP translation are located downstream from the adenine stretch in the core/ARFP sequence.

Next, we studied the impact of the stem-loop structure (5) (nt 388 to 508) for ARFP translation. The stem-loop is located adjacent to the adenine rich stretch. This sequence contains codon 26 which is proposed to mediate internal initiation of translation (ii₂₆ARFP) (19). To study the relevance of this structure, we introduced a longer core-encoding sequence (nt 342 to 460, type B constructs) in our HCV(H77)-luc reporter model system. In contrast to results obtained with the type A constructs, the core-luc synthesis was markedly

reduced in the constructs containing the HCV IRES (48 URL, pIV1123, Fig. 2A) and almost abolished in the cap-dependent translation constructs (8 URL without the IRES, pIV1166, Fig. 2B). These data indicate that the presence of the stem-loop (nt 388 to 425) pauses the ribosome during translation. Since +1 frame translation was low but unaffected by the presence or absence of the IRES we can argue that the weak +1 translation observed is due to the internal initiation of translation at position 26 and not to a frameshifting event.

Pseudoknot structures are known to help -1 frameshifting and are hypothetical for +1 events (13) In order to check if such a structure could increase the ARFP-luc translation by favoring the frameshift event previously proposed (6), we inserted a HCV(H77) sequence encoding about 90 amino acids (nt 342 to 630, type C constructs). This sequence contains all elements required for synthesis of fARFP, ii₂₆ARFP and ii_{86/88}ARFP (see Fig. 1A). In that sequence, translation in the +1 frame was at least as efficient as core-luc synthesis when the IRES sequence was present (compare 411/524 URL). Interestingly, translation efficiency was 30 times higher in the absence of IRES sequence (33/992 URL). Thus, the most efficient ARFP-luc translation was observed in constructs containing the adenine stretch and both internal initiation sites (compare pIV1118 Fig. 2A and pIV1164 in Fig. 2B). These data indicate that the region between nt 453 and 630 is required for efficient ARFP initiation of translation.

Finally, translation of the core-encoding sequence corresponding to the full length ARF sequence (nt 342 to 822, type D constructs) was studied. Both constructs showed a significant translation level in the +1 frame compared to core-luc. The translation ratio (ARFP-luc/Core-luc) was higher when the IRES was absent (compare 45/251 URL Fig. 2A and 62/94 URL Fig. 2B). However the level of translation was weaker than ARFP translation in type C constructs containing the adenine stretch, the stem-loop and until nt 630 of the ARF sequence. Nevertheless, the level of translation remained six times higher than translation of the type B constructs (containing the adenine stretch and the stem-loop) (Fig. 2A). This level increases to nine times without the IRES. In the type D constructs (containing the full-length ARF sequence) the translation rate in the +1 frame can account for different fusion proteins:

ii₂₆ARFP-luc and ii_{86/88}ARFP-luc but also fARFP-luc, since we can not exclude the possibility of a frameshifting event as a result of the full-length sequence context.

Luciferase activity was never detected with the -1 fusion constructs, confirming that translation in the +1 frame, although occurring at low level, was significant (Fig. 2). Addition of the proteasome inhibitor MG132 did not modify translation efficiency (data not shown) suggesting that differences in protein expression level are not due to differences in proteosomal degradation of HCV-luc fusion proteins.

We next investigated the impact of the HCV 3'NTR on ARFP translation. Viral 3' regions have been described to enhance translation, replication and play a potential role for HCV genome stabilization and/or encapsidation (24). The HCV 3'NTR is formed of three regions: a variable sequence, an internal poly (U/UC) stretch and the conserved X region. The poly (U/UC) tail and the highly structured and conserved X region are essential for replication in the chimpanzee (25, 26). Furthermore, the requirement of the HCV 3'NTR for core translation has been recently demonstrated (27, 28). To study the question whether the 3'NTR had an impact on core/ARFP translation, we added the HCV 3'NTR sequence downstream of the luciferase gene coding sequence in type D plasmids containing full length ARF sequence (nt 342 to 822) (Fig. 1, type E). Plasmids were linearized following the 3'NTR sequence to generate blunt-ended extremities similar to the authentic HCV RNA prior to transfection in Huh-7 cells. As shown in Fig. 2, the addition of the 3' NTR did not significantly modify ARFP translation in ARFP-luc expression constructs.

Translation of ARFP in the +1 frame occurs by internal initiation. We next asked the question of the origin of the enhancement of HCV-luc fusion proteins translation in the two latter types of constructs. Transfection of chimeric type C and type D ARF-luc constructs led to enhanced luciferase activities in the +1 frame compared to type chimeric HCV-luc type A and B plasmids (Fig. 2B). This could be the consequence of a downstream RNA structure enhancing fARFP production by +1 frameshifting, or of the recognition of codons 86/88 leading to the synthesis of ii_{86/88}ARFP by internal initiation of translation.

To distinguish frameshifting from internal initiation of translation, we introduced a stop codon at position 22 (*S₂₂) in the ARF sequence in type D sets of plasmids (containing the full length ARF sequence) (Fig. 3A) using site-directed mutagenesis. *S₂₂ stop mutation has no effect on core amino acid sequence but terminates synthesis of the fARFP-luc protein (Fig. 3B). Mutations were introduced into 0 frame fusion plasmids to study the impact of the *S₂₂ stop mutation on core translation, and into +1 frame fusion plasmids to determine which part of +1 frame translation was due to internal initiation of translation (Fig. 3A). In these constructs, the +1 frame luciferase expression represents protein synthesis beginning at amino acid 26 (ii₂₆ARFP) and/or aa 86/88 (ii_{86/88}ARFP). As shown in Fig. 3C, core protein translation (frame 0) was not affected by the *S₂₂ stop mutation. Using chimeric HCV-luciferase reporter constructs, we demonstrate that the +1 translation product was still present although the hypothetical frameshifting protein reading frame was prematurely terminated (Fig. 3C). Thus, we demonstrate (using the full length ARF sequence type D, nt 342 to 822), that internally initiated translation corresponded to 50% of the +1 luciferase activity measured without stop codon. Internal initiation was not influenced by the IRES element (data not shown). Thus, our experiments demonstrate that translation occurring in the +1 frame is the result of both a frameshifting event as well as internal initiation occurring downstream of the introduced stop codon at position 22. To determine the relative contribution of the two mechanistic events characterized translation products synthesized in the +1 frame, in Huh-7 cells transfected with plasmids containing the full length ARF sequence (type D, Fig. 1A). Since monoclonal anti-ARFP antibodies directed against epitopes of the ARFP N-terminal part were not available, ARFP-luc fusion proteins were analyzed using an anti-luc Mab (Sigma). Expected fusion proteins sizes were 60kD for luciferase, 78kD for the core/fARFP-luc fusion proteins, 75kD and 68kD for fusion proteins, synthesized by internal initiation at position 26 (ii₂₆ARFP-luc) and 86/88 (ii_{86/88}ARFP-luc), respectively. Background translation of the luciferase in fusion constructs was minimal, compared to expression of the fusion proteins (Fig. 4 lanes 4-5). The two forms detected for ARFP synthesis corresponded to products derived from internal initiation sites: the major band corresponded to

ii_{86/88}ARFP, whereas ii₂₆ARFP was synthesized at a lower level (Fig. 4). In our experimental system, fARFP was not detected. Since the addition of proteasome inhibitor MG-132 did not modify protein expression (data not shown), it is likely that the absence of detection was not due to a problem of fARFP stability. These results indicate that no +1/-2 frameshifting occurred in HCV(H77) RNA in transfected hepatoma cells. Thus, we conclude that the translation observed is predominantly due to iiARFP synthesis. It is conceivable that the decrease of ARFP-luc translation observed in the *S₂₂ mutated constructs is due to a decrease of internal initiation at position 26 (due to the mutation) rather than a suppression of a putative frameshifting event.

Suppression of ARFP internal initiation by HCV core protein. Core protein is known to play a role in HCV polyprotein translation. It has been described to diminish the translation activity of the IRES via interactions involving 5' regions (29). Whether this inhibition depends on RNA-RNA (30, 31) or core-RNA interactions (32, 33) remains unclear. Thus, we asked whether core plays a role for the regulation of ARFP translation.

First, we investigated the influence of core protein on the +1 frame translation in *cis*. Thus, we constructed plasmids containing a stop codon in the 0 frame (*Q₂₀) of the core-encoding sequence (type D, nt 342 to 822) fused in the +1 frame to the luc gene (Fig. 5A). In these plasmids, core protein is not synthesized whereas ARFP translation is maintained. Interestingly, in the absence of the core protein, we observed a significant four-fold enhancement of ARFP-luc fusion protein expression in the +1 frame (Fig. 5C, compare black and white bars). This observation could be due to the mutation itself or to the premature stop of core translation in the 0 frame resulting in the repression of ARFP synthesis. Alternatively, core protein could have an inhibitory effect on the ARFP translation.

To address this question, we studied the impact of core overexpression in *trans*. To ensure that the core protein was expressed in the entire transfected cell population, we constructed a recombinant adenovirus encoding the full-length core protein (Ad1080). As a control, we used an adenovirus encoding the green fluorescent protein (Ad285). The control

adenovirus itself enhanced the +1 frame translation about 1.5 times (Fig. 5B, 5C).

To test the latter hypothesis, we infected Huh-7 cells transfected with the plasmids containing the *Q₂₀ stop mutation with the core-encoding recombinant adenovirus (Ad 1080). The impact of the adenovirus on translation of these plasmids was first evaluated by using a GFP encoding adenovirus as a control. Again, the control adenovirus induced an enhancement of translation. However, using the core encoding adenovirus, we showed that the +1 frame translation decreased to levels similar to those obtained with non mutated plasmids (Fig. 5B, 5C). Since translation in the +1 frame is enhanced in the absence of core and is markedly reduced when core is added in *trans*, we conclude that the core protein has an inhibitory effect on the ARFP synthesis.

The inhibitory effect of core is corroborated by data obtained by western blot analysis of expressed proteins. As shown in Fig. 4, the expression of ii_{86/88}ARFP-luc fusion protein (pIV1204, lane 5) is increased in Huh-7 cells transfected with plasmids containing the *Q₂₀ stop mutation compared to plasmids allowing core protein expression in *cis* (pIV1144, lane 4). When core translation is absent (pIV1204, lane 5) ii_{86/88}ARFP represents the predominant ARFP translation product.

Discussion

The core-encoding sequence has been proposed to direct the synthesis of three different products: (i) the core protein in the 0 frame, (ii) the ARFP in the +1 frame and (iii) a 13 amino acid peptide in the -1 frame (5). The ARFP itself can result from a +1/-2 frameshifting event (6) (fARFP) and/or internal initiation in the +1 frame at codon 26 (19) (ii₂₆ARFP) and 86/88 (20) (ii_{86/88}ARFP). To compare translation levels of these proteins, we designed plasmids containing various lengths of the core sequence fused in the 0, +1 or -1 frame to a luciferase reporter gene cDNA. Using hepatoma cells transfected with chimeric HCV-luciferase reporter constructs as a model system, we demonstrate that core protein and ARFP synthesis occur by different mechanisms. ARFP synthesis is directed by internal initiation of translation whereas core is dependent of IRES initiation of translation (34). In contrast to

previous studies, we did not observe evidence for frameshifting as a mechanism for ARFP synthesis. Furthermore, we demonstrate that the predominant form of ARFP is a 70 amino acid protein initiated at codon 86/88. Finally, we found that core protein regulates ARFP synthesis by inhibiting ii_{86/88}ARFP translation.

The +1/-2 frameshifting event was recently demonstrated *in vitro* by Xu *et al.*, (6) using a particular sequence of genotype 1a containing a 10-adenine stretch in the first 50 nucleotides of the core sequence (6). This A stretch appears to be very rare since only one HCV sequence of this type is found in the European HCV database (<http://euhcvdb.ibcp.fr/>) (35). In contrast to this previous study, we used the H77 infectious clone (36) and demonstrated that frameshifting (+1 or -1) was not induced by the AAAGAAAAA sequence of this clone. Thus, this finding does not favor a mechanism leading to ARFP synthesis *via* frameshifting. IRES-independence of the ARFP translation could be related to the nature of codon GUG at codon 26 in the genotype 1a that we used. Indeed, in a recent report, Baril and Brakier-Gingras (19) have shown that the ARFP translation is IRES-independent when a GUG codon is present at this position which is the case in the 1a genotype (19).

Using expression constructs including the potential frameshifting sequence, the stem-loop structure and one or more internal initiation sites (type B, C, D constructs), we demonstrate that the two internal initiation sites are required for efficient ARFP synthesis. Results obtained with type C constructs clearly demonstrate that the internal translation is clearly initiated at codons 86/88.

The addition of HCV 3'NTR induced a minimal decrease on translation in the 0 or +1 frame suggesting that HCV genetic element is not required for ARFP translation. Nevertheless, our system is limited to the ARFP sequence. We can not exclude results might be different using a full length infectious clone as a model system. However, the difficulty to study translation of the short +1 frame protein in the full-length clone precludes the use of this system to address this question at present time.

Finally, we demonstrate for the first time, that HCV core plays an important role in the regulation of ARFP translation in hepatoma

cells. Using non sense mutations in the core coding sequence, we demonstrate that core protein inhibits ARFP synthesis. This effect is abolished when core protein is silenced by insertion of a stop codon mutation and can be restored by overexpression of core in *trans*.

The effect of core in *trans* is also supported by the increase in translation of the type C constructs in comparison with the type D constructs containing the core ORF. Indeed in cells transfected with type C constructions, the core protein is not produced thus ARFP-luc synthesis may not be inhibited by the presence of core. The enhanced translation of ARFP-luc proteins of type C constructs may also be facilitated by the design of the constructs with codon 86/88 of the ARFP being very close to the luciferase reading frame.

Since the two proteins share at least partially the same RNA sequence, a switch between ARFP and core translation can be imagined during the viral cycle. Core is the capsid protein. Its level may vary during the viral life cycle (i.e. during encapsidation), allowing a modification of ARFP translation efficiency. ARFP could also be synthesized when core is expressed at a lower rate, i.e. during chronic infection, when viral replication can be low.

Core-mediated regulation of the ARFP translation may have important implications for the role of ARFP in the viral cycle. Interaction of core protein with its RNA coding sequence has been described (29). Thus, ARFP translation may be silenced in the presence of core protein bound to the RNA and this structural inhibition is reversed when core is expressed at low levels or is channeled into the formation of the nucleocapsids. Alternatively, the observed inhibition of ARFP expression by core may have an important role in suppressing the putative ARFP function. Such a mechanism could result in the establishment of a stoichiometric balance between ARFP and core, reminiscent of the translation regulation existing in HIV, where Env protein expression is high and related to a weak Vpu protein synthesis (37).

The impact of the ARFP role for the viral cycle is still unclear. Since the existence of an additional protein in another reading frame has not yet been described for other *Flaviviridae*, we looked for the presence of similar proteins similarities in other virus

families. Similar to HCV, the translation of picornaviruses is IRES-dependent resulting in the synthesis of a polyprotein cleaved into structural and non structural proteins. For encephalomyocarditis virus (EMCV), foot and mouth disease virus (FMDV), hepatitis A virus and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) additional initiation sites exist in the same frame, and have been documented *in vitro* (EMCV and hepatitis A) (38, 39) or *in vitro* and *in vivo* (FMDV) (40). Initiation sites for L* protein in the +1 frame both *in vitro* and *in vivo* have been identified for TMEV (41). The TMEV L* out of frame protein was first thought to be an artifact of *in vitro* translation, but has been shown to have an anti-apoptotic activity and to be involved in pathogenesis and persistence leading to an inflammatory demyelination (42). Thus, it is conceivable that ARFP may also have a role in the HCV viral life cycle. Although, ARFP does not appear to be required for viral replication (43), it may play a role in other parts of the viral life cycle. HCV infected patients mount an easily detectable, humoral immune response directed against ARFP, suggesting that this protein is efficiently expressed *in vivo*. The

short protein half-life of about 10 minutes (10, 11) could be associated with a punctual action during the viral cycle in this case. The recent establishment of a tissue culture system for infectious HCV particles (44-46) will help to get more insights into functions of viral proteins, and may finally lead to the identification of the role of ARFP in the viral cycle.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Charles M. Rice for providing the p90/HCV FL-Long pU clone, TRANSGENE S.A. (Strasbourg, France) for generously supplying shuttle plasmids pTG13387 and pTG6624, Glauca Paranhos-Baccala (BioMerieux, Lyon, France) for the kind gift of monoclonal anti-ARFP antibodies and Marie Parnot for excellent technical assistance in sequencing. MW was supported in part by the French Ministry of Research grant (MRT) and by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer. The study was supported by FRM-BNP Paribas and Inserm/ULP.

REFERENCES

1. Wasley, A. and M.J. Alter. (2000) Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* **20**(1): p. 1-16.
2. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. (1994) Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* **68**(6): p. 3631-41.
3. Matsuura, Y., S. Harada, R. Suzuki, Y. Watanabe, Y. Inoue, I. Saito, and T. Miyamura. (1992) Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J Virol.* **66**(3): p. 1425-31.
4. Dimitrova, M., I. Imbert, M.P. Kieny, and C. Schuster. (2003) Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* **77**(9): p. 5401-14.
5. Walewski, J.L., T.R. Keller, D.D. Stump, and A.D. Branch. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna.* **7**(5): p. 710-21.
6. Xu, Z., J. Choi, T.S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M.J. Selby, and J. Ou. (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J.* **20**(14): p. 3840-8.
7. Varaklioti, A., N. Vassilaki, U. Georgopoulou, and P. Mavromara. (2002) Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem.* **277**(20): p. 17713-21.
8. Bain, C., P. Parroche, J.P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, et al. (2004) Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* **78**(19): p. 10460-9.
9. Komurian-Pradel, F., A. Rajoharison, J.L. Berland, V. Khouri, M. Perret, M. Van Roosmalen, S. Pol, F. Negro, and G. Paranhos-Baccala. (2004) Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* **40**(4): p. 900-9.
10. Xu, Z., J. Choi, W. Lu, and J.H. Ou. (2003) Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol.* **77**(2): p. 1578-83.
11. Roussel, J., A. Pillez, C. Montpellier, G. Duverlie, A. Cahour, J. Dubuisson, and C. Wychowski. (2003) Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol.* **84**(Pt 7): p. 1751-9.
12. Farabaugh, P.J. and G.R. Bjork. (1999) How translational accuracy influences reading frame maintenance. *Embo J.* **18**(6): p. 1427-34.
13. Giedroc, D.P., C.A. Theimer, and P.L. Nixon. (2000) Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting. *J Mol Biol.* **298**(2): p. 167-85.
14. Ferracci, F., J.B. Day, H.J. Ezelle, and G.V. Plano. (2004) Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in *Yersinia pestis* is the result of a +1 translational frameshift event. *J Bacteriol.* **186**(15): p. 5160-6.
15. Ivanov, I.P., C.B. Anderson, R.F. Gesteland, and J.F. Atkins. (2004) Identification of a new antizyme mRNA +1 frameshifting stimulatory pseudoknot in a subset of diverse invertebrates and its apparent absence in intermediate species. *J Mol Biol.* **339**(3): p. 495-504.
16. Saulquin, X., E. Scotet, L. Trautmann, M.A. Peyrat, F. Halary, M. Bonneville, and E. Houssaint. (2002) +1 Frameshifting as a novel mechanism to generate a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human interleukin 10. *J Exp Med.* **195**(3): p. 353-8.
17. Hwang, C.B., B. Horsburgh, E. Pelosi, S. Roberts, P. Digard, and D.M. Coen. (1994) A net +1 frameshift permits synthesis of thymidine kinase from a drug-resistant herpes simplex virus mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(12): p. 5461-5.
18. Weiss, R.B., D.M. Dunn, J.F. Atkins, and R.F. Gesteland. (1987) Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5, and +6 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **52**: p. 687-93.
19. Baril, M. and L. Brakier-Gingras. (2005) Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res.* **33**(5): p. 1474-86.

20. Vassilaki, N. and P. Mavromara. (2003) Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem.* **278**(42): p. 40503-13.
21. Imbert, I., M. Dimitrova, F. Kien, M.P. Kieny, and C. Schuster. (2003) Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol.* **84**(Pt 6): p. 1549-57.
22. Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science.* **277**(5325): p. 570-4.
23. Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterle, A. Pavirani, and M. Mehtali. (1996) Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol.* **70**(7): p. 4805-10.
24. Dreher, T.W. (1999) Functions of the 3'-Untranslated Regions of Positive Strand Rna Viral Genomes. *Annu Rev Phytopathol.* **37**: p. 151-174.
25. Yanagi, M., M. St Claire, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. (1999) In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(5): p. 2291-5.
26. Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol.* **74**(4): p. 2046-51.
27. Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager, and M. Niepmann. (2006) The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region strongly enhances Translation directed by the Internal Ribosome Entry Site. *J Virol.*
28. Bradrick, S.S., R.W. Walters, and M. Gromeier. (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res.* **34**(4): p. 1293-303.
29. Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura. (1999) Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol.* **73**(12): p. 9718-25.
30. Wang, T.H., R.C. Rijnbrand, and S.M. Lemon. (2000) Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol.* **74**(23): p. 11347-58.
31. Kim, Y.K., S.H. Lee, C.S. Kim, S.K. Seol, and S.K. Jang. (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna.* **9**(5): p. 599-606.
32. Zhang, J., O. Yamada, H. Yoshida, T. Iwai, and H. Araki. (2002) Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology.* **293**(1): p. 141-50.
33. Li, D., S.T. Takyar, W.B. Lott, and E.J. Gowans. (2003) Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol.* **84**(Pt 4): p. 815-25.
34. Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* **66**(3): p. 1476-83.
35. Combet, C., F. Penin, C. Geourjon, and G. Deleage. (2004) HCVDB: hepatitis C virus sequences database. *Appl Bioinformatics.* **3**(4): p. 237-40.
36. Yanagi, M., R.H. Purcell, S.U. Emerson, and J. Bukh. (1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(16): p. 8738-43.
37. Schwartz, S., B.K. Felber, E.M. Fenyo, and G.N. Pavlakis. (1990) Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol.* **64**(11): p. 5448-56.
38. Kaminski, A., M.T. Howell, and R.J. Jackson. (1990) Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism. *Embo J.* **9**(11): p. 3753-9.

39. Tesar, M., S.A. Harmon, D.F. Summers, and E. Ehrenfeld. (1992) Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons. *Virology*. **186**(2): p. 609-18.
40. Clarke, B.E., D.V. Sangar, J.N. Burroughs, S.E. Newton, A.R. Carroll, and D.J. Rowlands. (1985) Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *J Gen Virol*. **66 (Pt 12)**: p. 2615-26.
41. Kong, W.P. and R.P. Roos. (1991) Alternative translation initiation site in the DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol*. **65**(6): p. 3395-9.
42. van Eyll, O. and T. Michiels. (2002) Non-AUG-initiated internal translation of the L* protein of Theiler's virus and importance of this protein for viral persistence. *J Virol*. **76**(21): p. 10665-73.
43. McMullan, L., A. Grakoui, M. Puig, K. Mihalik, A.D. Branch, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. (2004) Multiple stop codons in the HCV ARF suggest that expression of F/ARFP is not essential for virus replication but reveal a functional RNA element. in *11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. Heidelberg, Germany.
44. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, S.F. Wieland, S.L. Uprichard, T. Wakita, and F.V. Chisari. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(26): p. 9294-9.
45. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. **309**(5734): p. 623-6.
46. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. **11**(7): p. 791-6.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Design of core-luciferase and ARFP-luciferase expression constructs. (A) Type A constructs contain the frameshift site, type B the frameshift site, the stem-loop and the first site of internal initiation (codon 26), type C all the proposed initiation of translation sites, type D the full-length ARFP sequence and type E the full-length ARFP sequence and 3'NTR. Above each type of plasmids, nucleotides limits of the sequences and potential translation products are represented. (core in black, ARFP in grey and luciferase in white). Names of the plasmids are indicated on the right panels. (B) Proteins resulting of each type of plasmid translation in the 0 and +1 frames.

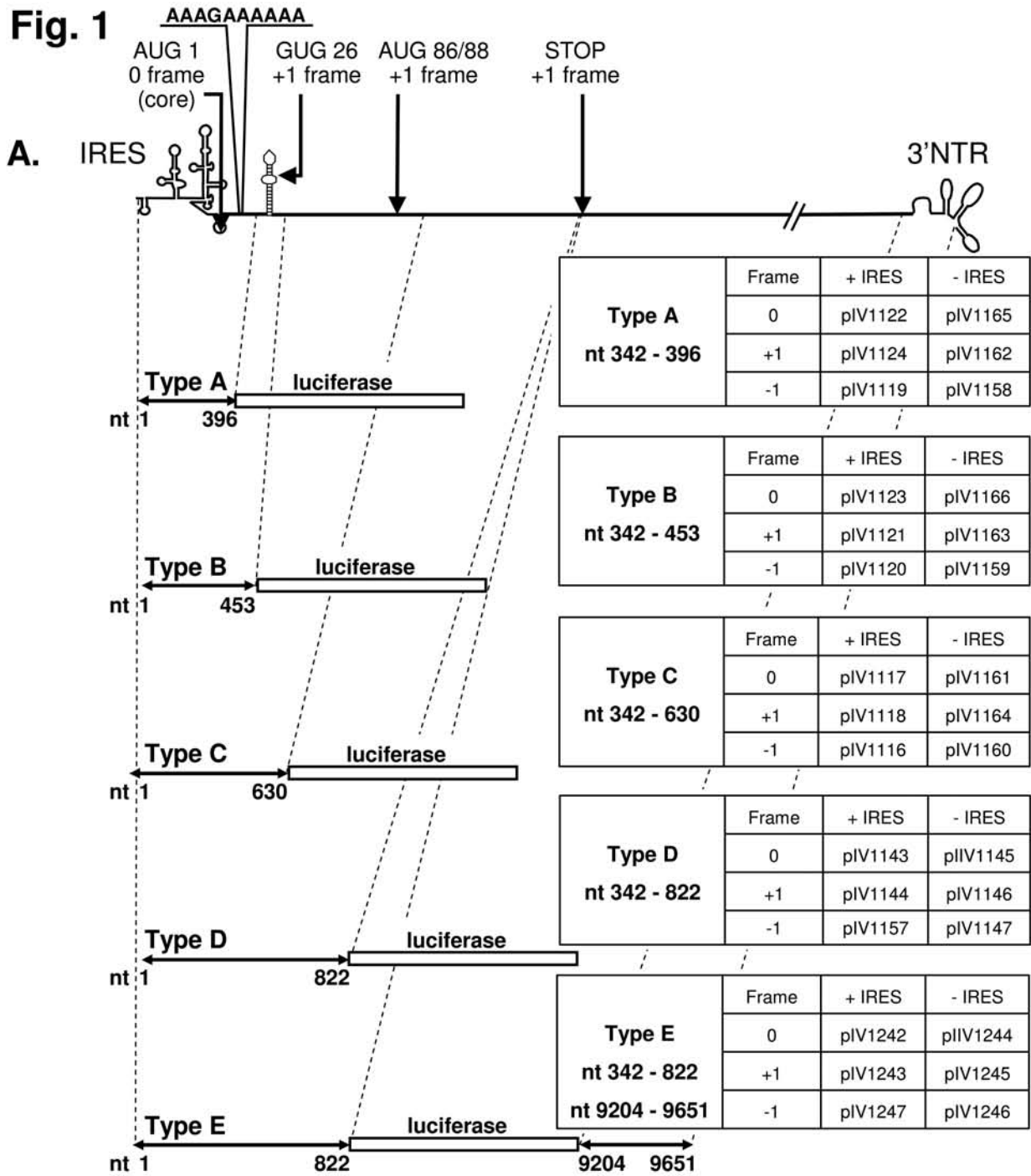
Fig. 2. Translation of chimeric HCV core-luciferase sequences in frame 0, +1 and -1 in hepatoma cells. Plasmids containing various lengths of the core coding sequence (type A, B, C, D or E) fused to a luciferase gene reporter cDNA were transfected into Huh-7 cells. Translation of HCV 5' sequences were studied in the three frames (0 core frame in black, +1 ARFP frame in grey and -1 in white) and in presence (A) or absence (B) of the IRES sequence by luciferase activity quantification. Sequence specificities corresponding to each type of plasmid are indicated.

Fig. 3. Internal initiation of ARFP translation in the +1 frame. (A) Core Δ fARFP and ARFP Δ fARFP plasmids containing a *S₂₂ stop codon mutation in the +1 frame resulting in knock out fARFP expression. Plasmid numbers are indicated. (B) Proteins resulting of each type of plasmid translation in the 0 and +1 frames. (C) Huh-7 cells were transfected with constructs shown in (A) in the presence of the IRES sequence and luciferase activity was assessed as described in Materials and Methods. Black and grey bars correspond to HCV RNA translation in the 0 and +1 frames, respectively.

Fig. 4. Identification of luciferase fusion proteins. Lysates of Huh-7 cells transfected with the luciferase encoding plasmid (pIV1066, lane 1), the empty pCI-neo vector (Mock, lane 2), or with plasmids containing sequences encoding core-luc (pIV1143, lane 3), ARF-luc (pIV1144, lane 4) or ARF-luc containing the *Q₂₀ core mutation (pIV1204, lane 5) were analyzed by western blotting using an anti-luciferase Mab as described in Material and Methods.

Fig. 5. Impact of the core protein on ARFP translation in Huh-7 cells. (A) Plasmids containing a stop codon in the 0 frame (*Q₂₀). Names of the plasmids are indicated on the panel (B) Proteins resulting of translation in the 0 and +1 frames from constructs containing a deletion of the core ORF (C,D) **To study the effect of core in cis we transfected cells with constructions containing or not the Q₂₀ mutation.** Luciferase activities corresponding to the translation in the +1 frame without (black bars) and with the *Q₂₀ stop mutation (white bars). (D) **To study the effect of core in trans we transfected cells with constructions containing or not the Q₂₀ mutation.** Transduction of transfected cells was realised with a control (Ad285) or a Core encoding adenovirus (Ad1080). All luciferase activities are measured in presence or absence of the HCV IRES.

Fig. 1



B.

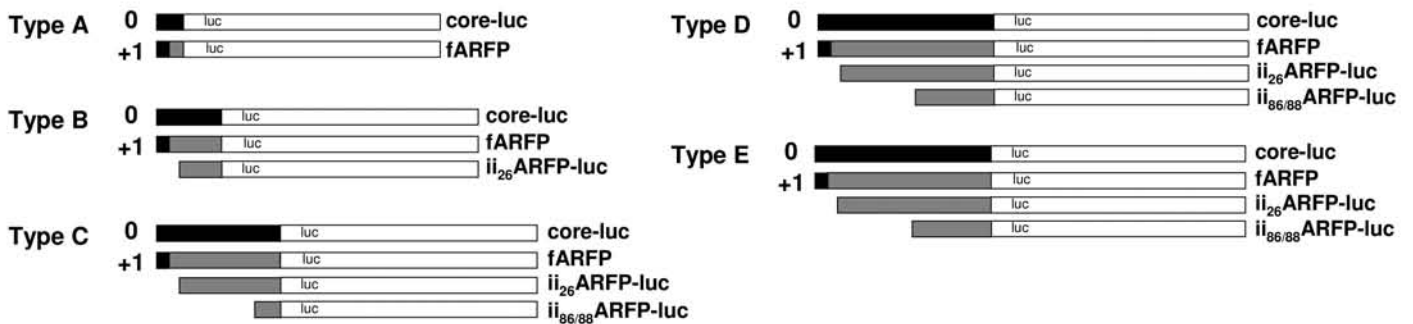


Fig. 2

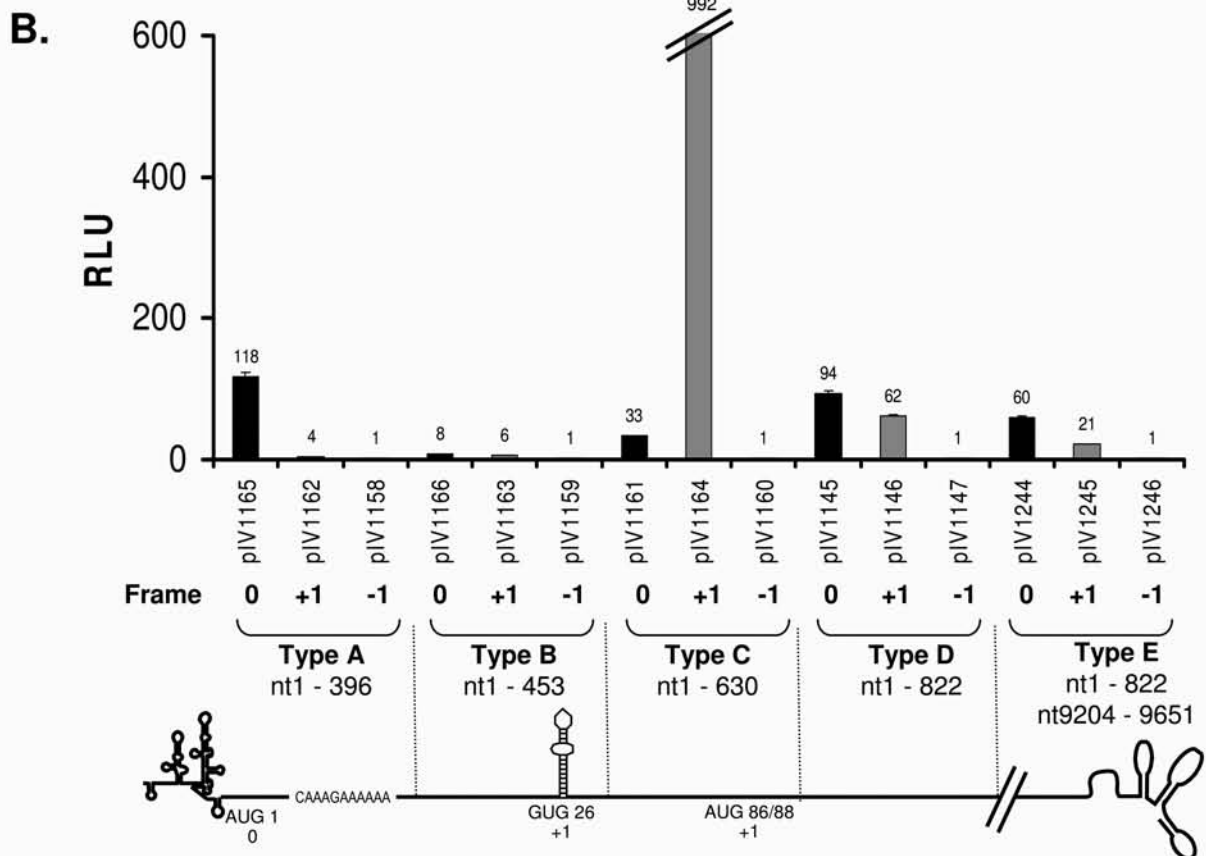
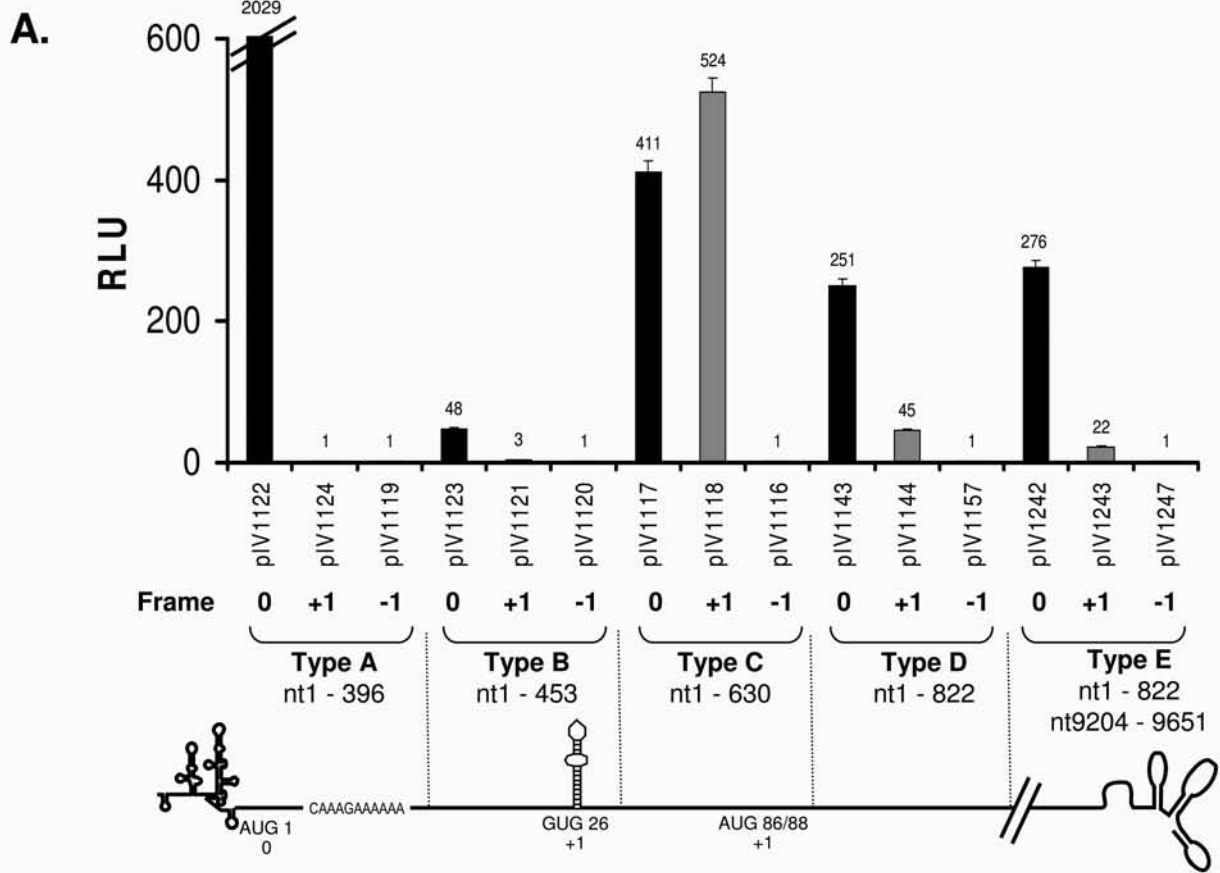


Fig. 3

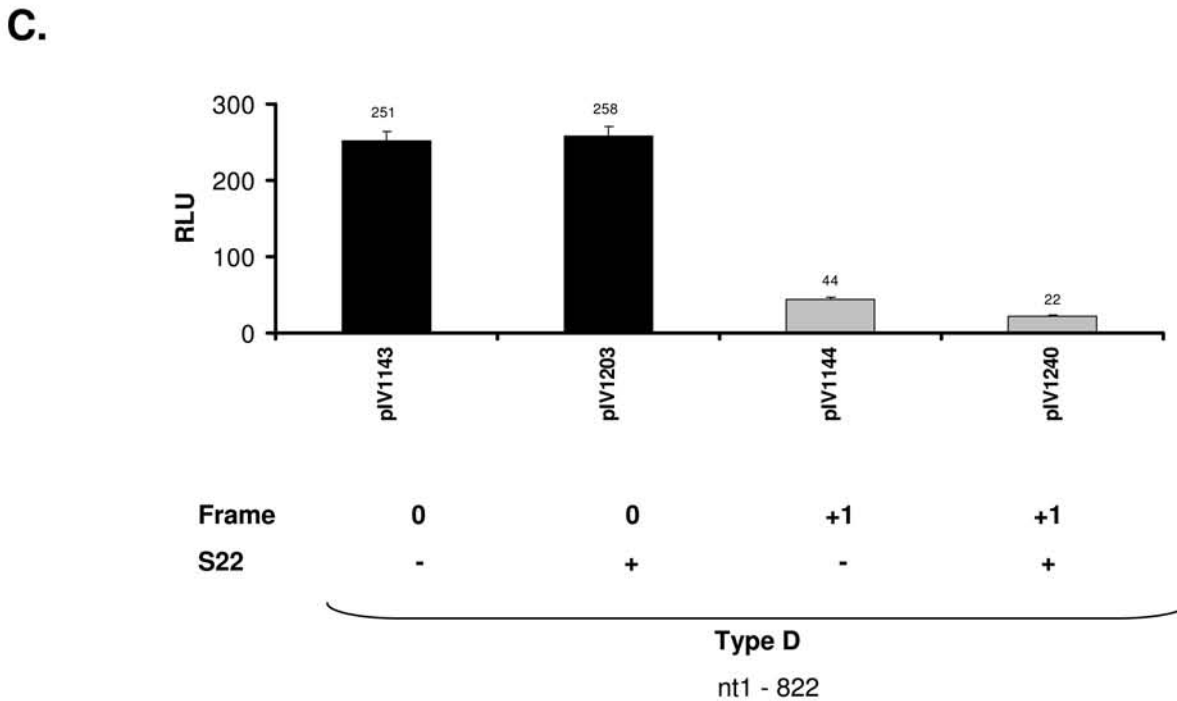
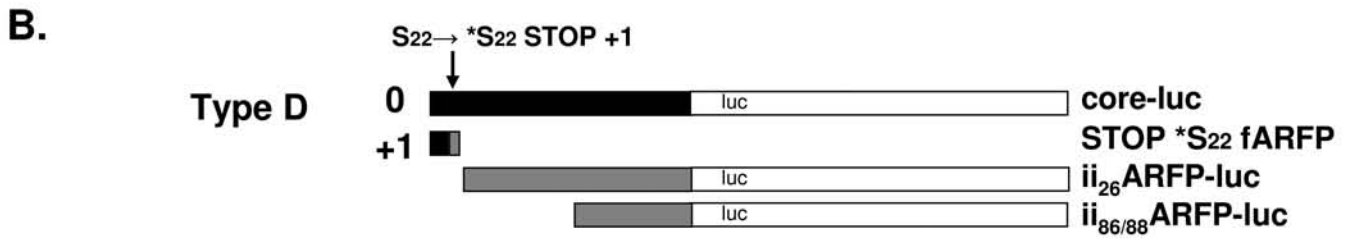
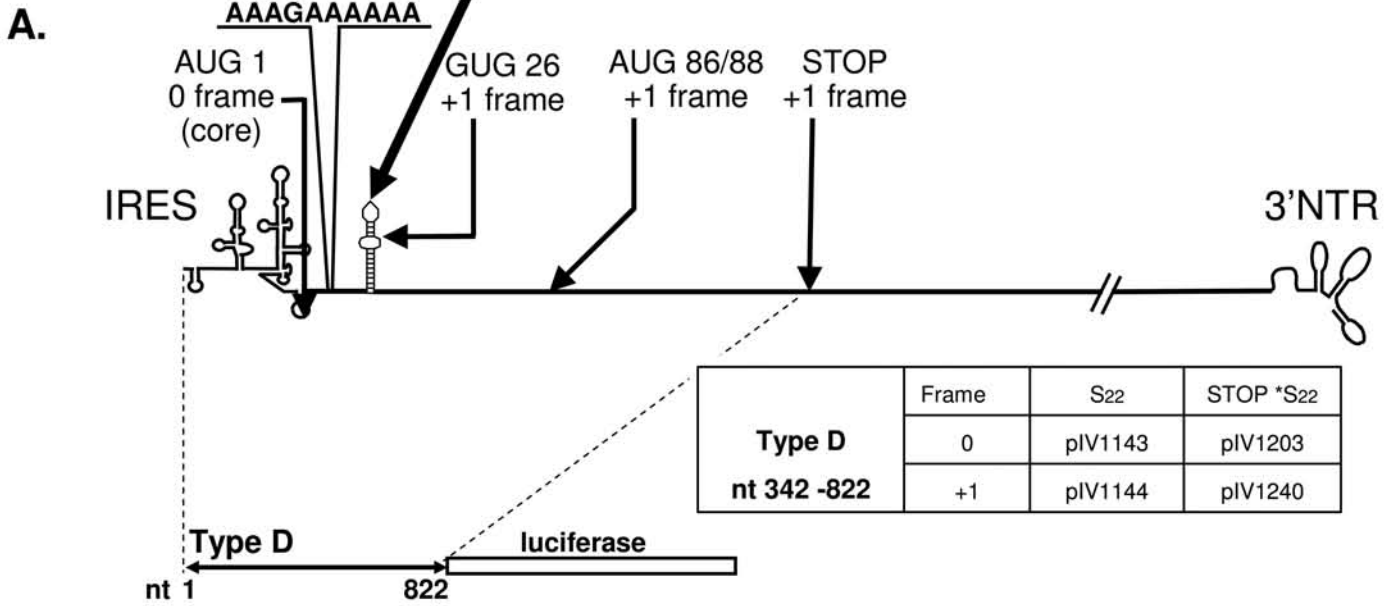


Fig. 4

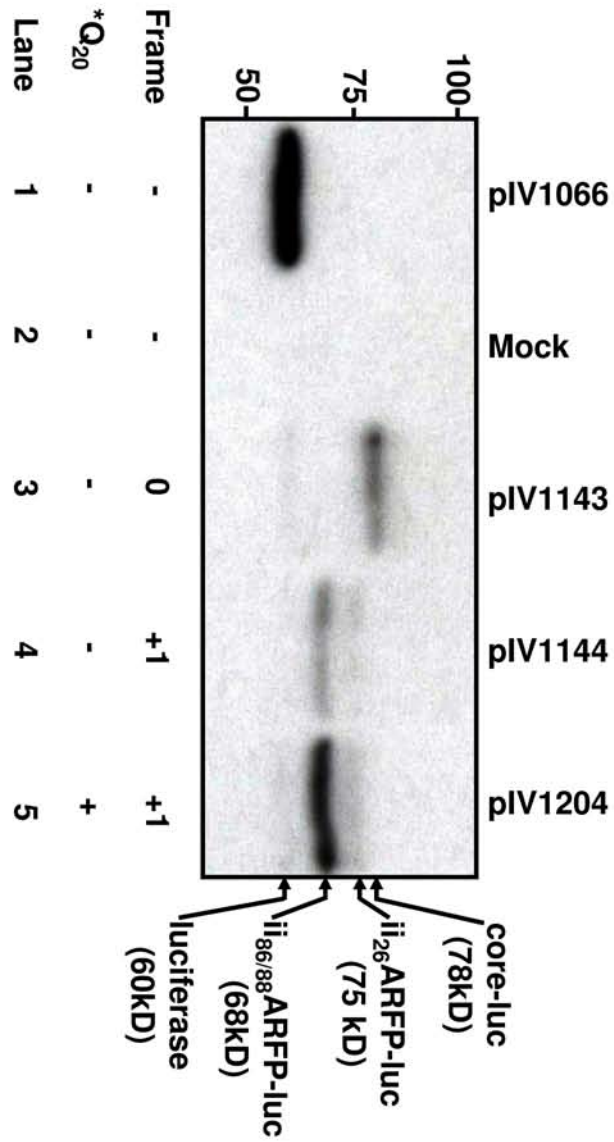
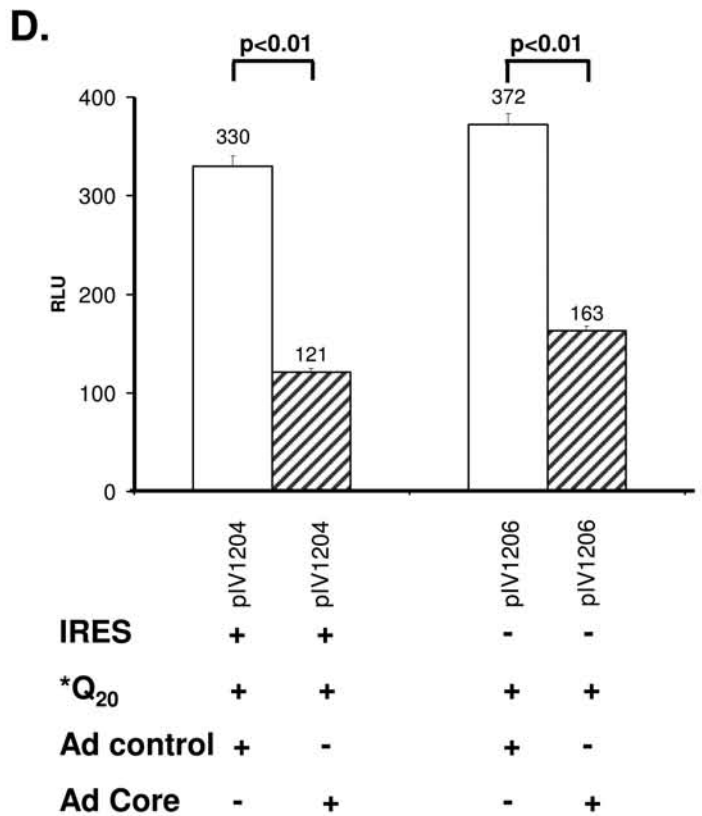
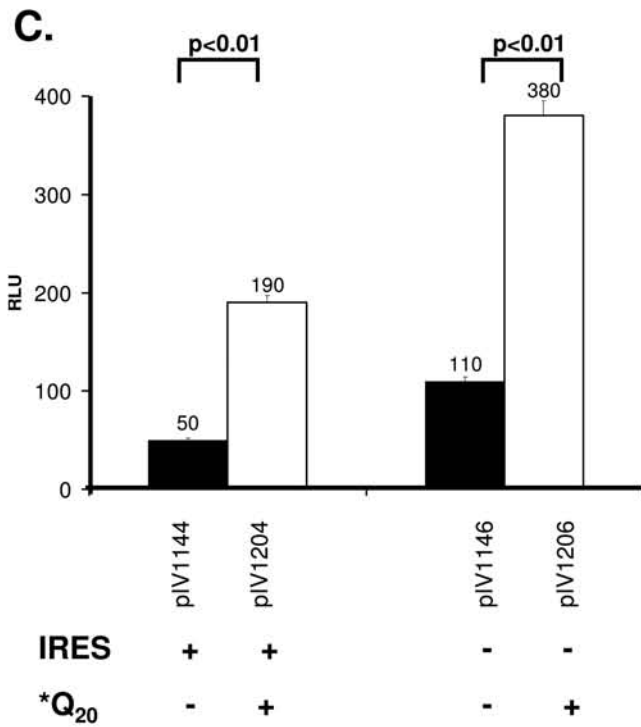
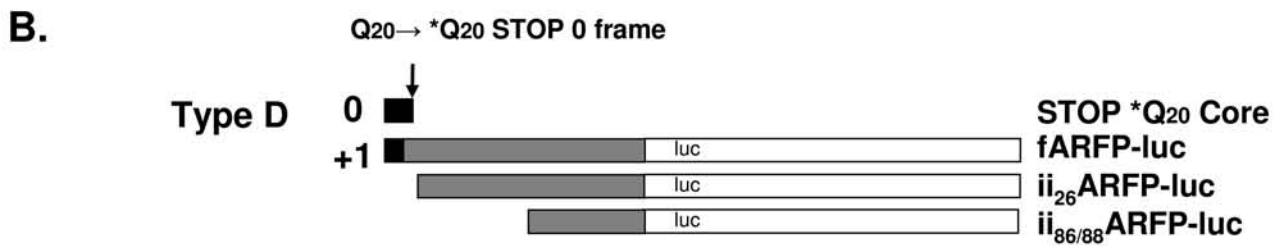
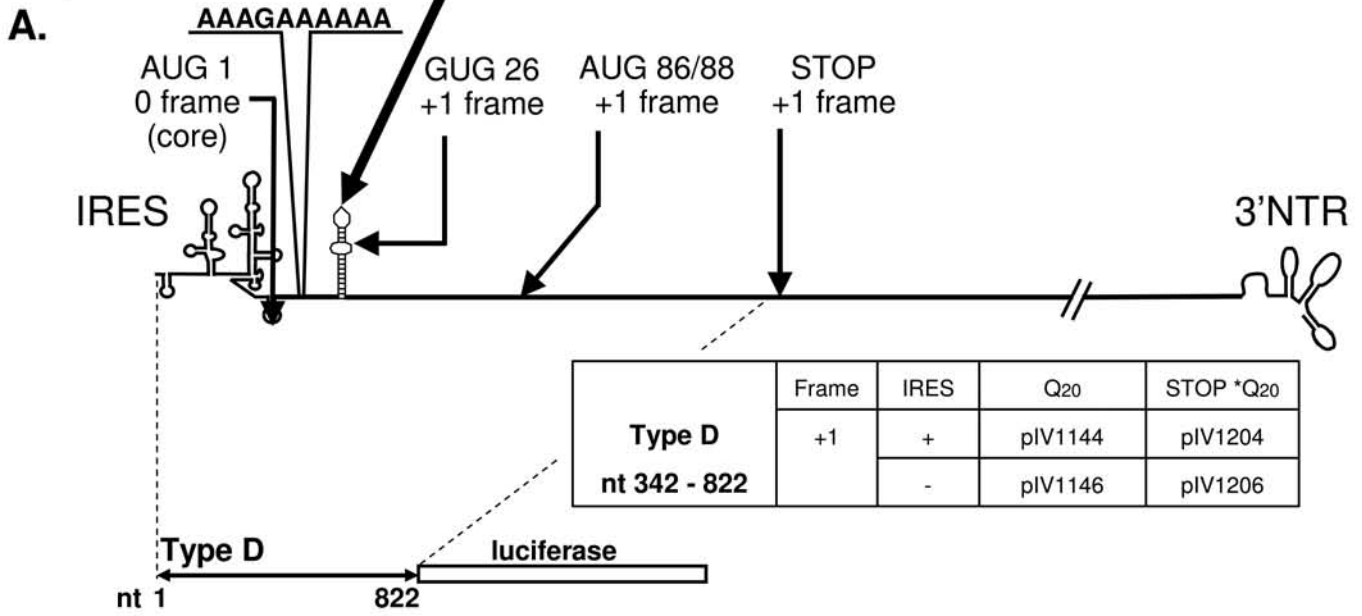


Fig. 5



IV. Résultats complémentaires

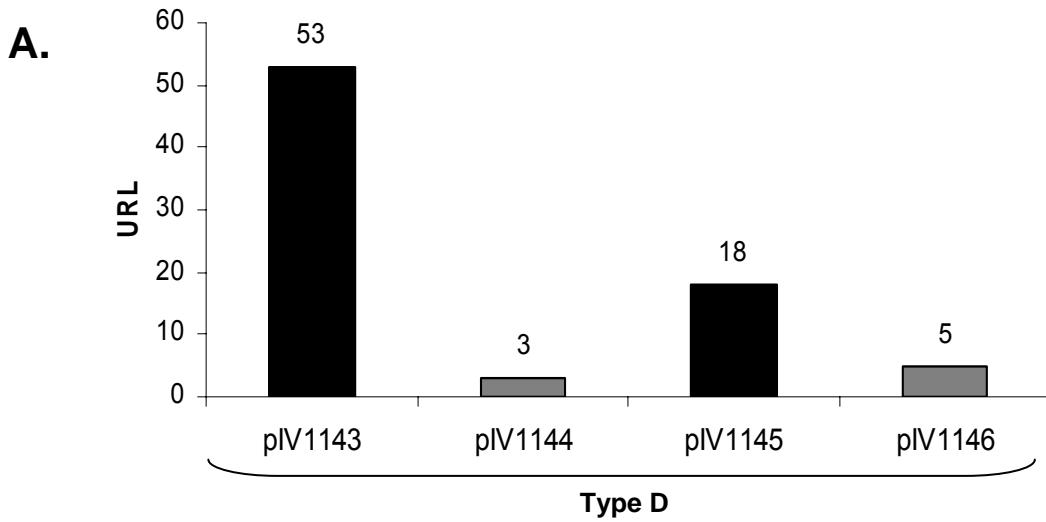
D'autres paramètres pouvant avoir une influence sur le(s) mécanisme(s) de traduction de la protéine ARFP ont été testés, ces résultats ne figurent pas dans la publication et seront présentés dans cette section.

L'ensemble des constructions plasmidiques utilisées lors de notre étude est résumé dans l'**annexe II**. Nous avons ainsi obtenu les constructions de type C et D clonées en fusion avec la luciférase dans les 3 cadres de lecture avec ou sans la séquence de l'IRES, avec ou sans les mutations *Q₂₀ et *S₂₂ et en présence ou en absence de l'extrémité 3'NTR. Leur transfection en lignée cellulaire n'a pas apporté d'information supplémentaire sur la traduction de la protéine ARFP ou sa régulation, mais toutes les questions qui pouvaient être posées dans notre système en fusion à la luciférase ont été adressées.

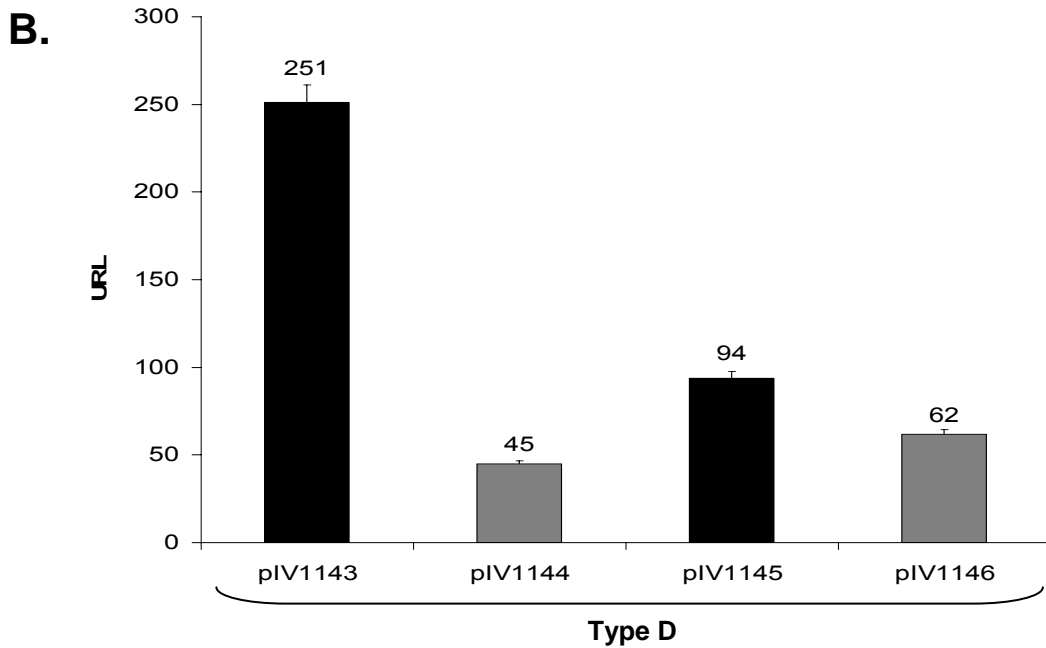
IV.1 Influence de la lignée cellulaire sur la traduction d'ARFP

IV.1.1 HEK293 et HeLa

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées au cours de cette étude. Les cellules Huh-7 d'origine hépatocytaire sont les plus couramment utilisées pour l'étude du VHC, car il s'agit d'une des rares lignées capable de répliquer le virus (Lohmann *et al.* 1999). Si le choix de cette lignée était évident, nous avons également réalisé en parallèle toutes nos expériences dans les lignées HEK293 d'origine rénale ou HeLa issues d'un adénocarcinome humain du col de l'utérus. Ceci a été réalisé pour deux raisons principales. Tout d'abord, il nous paraissait essentiel de déterminer si les effets mesurés lors de la traduction étaient liés à l'origine tissulaire de la cellule utilisée. Le tropisme du VHC étant très restreint et majoritairement hépatique, l'action d'une protéine spécifique à la cellule hépatique était envisageable. D'autre part, d'un point de vue pratique les cellules Huh-7 se transfectent mal, pas du tout avec la technique de phosphate de calcium et avec une efficacité estimée au laboratoire de l'ordre de 30% avec des agents cationiques. L'utilisation de la lignée Huh-7 est donc à priori un frein supplémentaire à l'étude de la protéine ARFP qui est déjà faiblement



IRES	+	+	-	-
Phase	0	+1	0	+1



IRES	+	+	-	-
Phase	0	+1	0	+1

Figure 42. Mesure de la traduction en phase 0 et +1 de la séquence core dans des hépatocytes primaires (A) et dans les cellules Huh-7 (B).

produite dans les conditions les plus favorables. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les données acquises dans les lignées hépatocytaires ou celles obtenues avec les autres lignées. Ceci démontre que la traduction de la protéine ARFP observée dans notre système n'est pas dépendante d'un facteur hépatocytaire spécifique.

IV.1.2 Hépatocytes primaires

En plus des lignées cellulaires utilisées, nous avons pu une seule fois mesurer la traduction d'ARFP-luc dans des hépatocytes primaires. Ces conditions étant les plus proches de l'infection naturelle, la reproduction des résultats obtenus en lignée dans ce système nous paraissait essentielle. En effet, nous ne pouvions pas exclure que la lignée Huh-7 ne possédait pas toutes les caractéristiques de la cellule hépatique primaire.

Les hépatocytes ont été transfectés par un agent cationique avec une efficacité relativement faible, mais nous avons tout de même réussi à mesurer des activités luciférase. Les résultats sont présentés dans la **figure 42A**.

Il ne s'agit que d'une seule expérience, chaque point étant toutefois réalisé en triple. Ces données ne nous permettent donc pas de conclure de manière définitive mais de dégager une tendance. Dans les hépatocytes primaires, les activités luciférases sont plus faibles que celles mesurées en lignée Huh-7 mais on détecte une traduction de core relativement forte et d'ARFP, plus faible. Ce schéma est comparable avec la tendance observée lors des expériences en cellules Huh-7 (**Fig. 42B**). Les hépatocytes primaires n'étant que très rarement disponibles, nous n'avons pas eu l'occasion de recommencer ces expériences. Ces résultats préliminaires sont cependant encourageants car ils indiquent que la traduction a lieu de façon comparable dans les hépatocytes primaires et dans les cellules Huh-7. Cette lignée est donc un bon modèle d'étude.

IV.2 Estimation de la stabilité de ARFP

Des études de demi-vie ont démontré que la protéine ARFP est très instable dans la cellule, sa demi-vie n'excédant pas 10 minutes (Xu *et al.* 2003). Pour mettre en évidence l'existence de la protéine ARFP, divers inhibiteurs de protéases ont été testés. Seul le MG-132, un inhibiteur de protéasome, empêche la dégradation d'ARFP dans la cellule (Roussel *et al.* 2003).

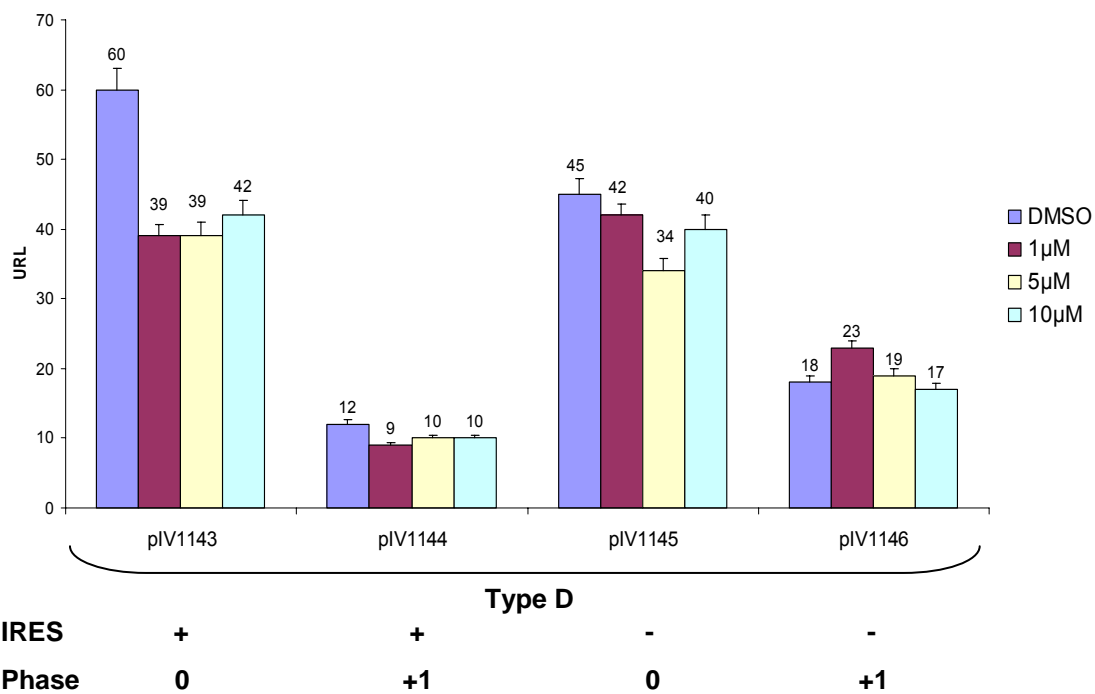


Figure 43. Evaluation de la stabilité d'ARFP en présence de l'inhibiteur de protéasome MG132.

Pour évaluer l'effet du MG-132 sur la stabilité des fusions ARFP-luc dans nos expériences, nous avons testé différentes conditions d'incubation de cet inhibiteur avec les cellules Huh-7 transfectées avec les plasmides en fusion à la luciférase (**Fig. 43**). Le MG-132 est très toxique pour la cellule et les données bibliographiques suggèrent de l'utiliser à une concentration de 5µM pendant 16h au maximum, ce que nous avons vérifié. Nous avons ensuite mesuré l'effet de différentes concentrations de ce produit, une solution de DMSO étant utilisée comme témoin.

Au-delà de 10 µM pendant 16h, la mort cellulaire est très importante, cette dose n'est d'ailleurs jamais dépassée dans la littérature. Quelle que soit la concentration de MG-132 utilisée, aucun effet stabilisateur de cette molécule n'a pu être observé ni sur core-luc, ni sur ARFP-luc. Ainsi nous pouvons conclure que la protéine ARFP exprimée en fusion à la luciférase ne présente pas de problème de stabilité et que la luciférase protège cette dernière de la dégradation par la voie du protéasome.

IV.3 Etude de la traduction d'ARFP in vitro

Nous avons fait le choix de réaliser cette étude de la traduction d'ARFP en lignée cellulaire d'origine hépatique, modèle le plus proche de l'infection naturelle. Néanmoins, certaines questions restaient posées. Les transfections transitoires impliquent que les plasmides soient transcrits dans la cellule en ARNs qui sont coiffés puis traduits. L'influence de cette traduction coiffe-dépendante ne peut pas être estimée lors de nos expériences en lignée cellulaire. D'autre part, il a été démontré qu'un promoteur de transcription est présent dans la forme ADN de la région 5'NTR (Dumas *et al.* 2003). L'utilisation de constructions plasmidiques avec IRES pourrait donc induire un biais au niveau transcriptionnel, l'ARN n'étant pas forcément intègre. Toutefois, core et ARFP étant traduites à partir du même ARN, ce biais devrait théoriquement être retrouvé de la même façon dans les deux cas et ne devrait pas gêner nos mesures comparatives mais pourrait cacher un effet spécifique de l'IRES. Ceci devait être vérifié.

La réponse à ces deux questions ne pouvait être apportée qu'*in vitro* ou mieux par transfection de l'ARN correspondant à nos plasmides dans les cellules Huh-7. Comme nous ne disposons pas d'un électroporateur de cellules eucaryotes, nous avons choisi la première alternative. Les ARNs ont été transcrits *in vitro* à partir de nos plasmides, dosés et traduits *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin.

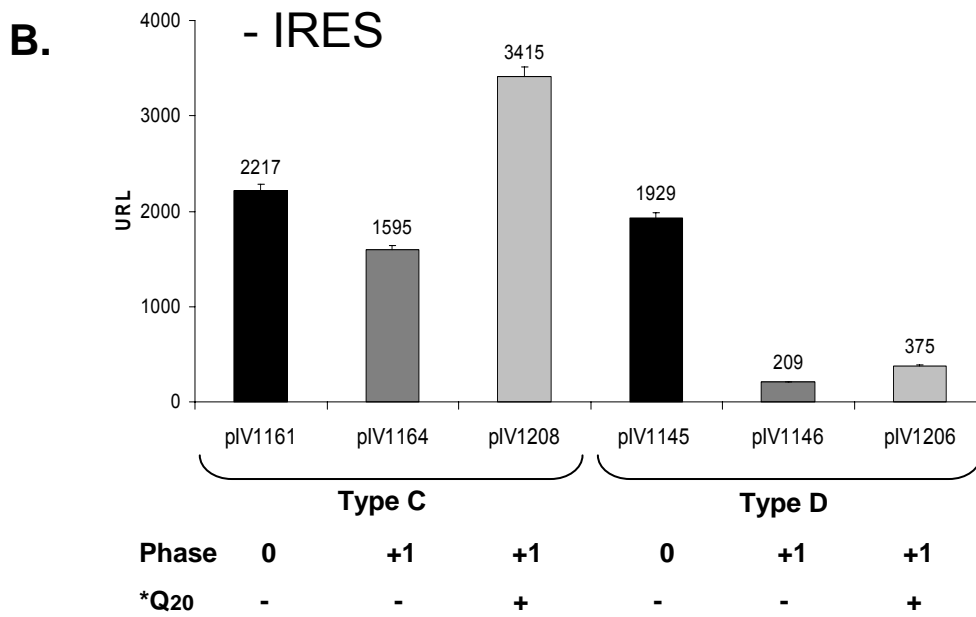
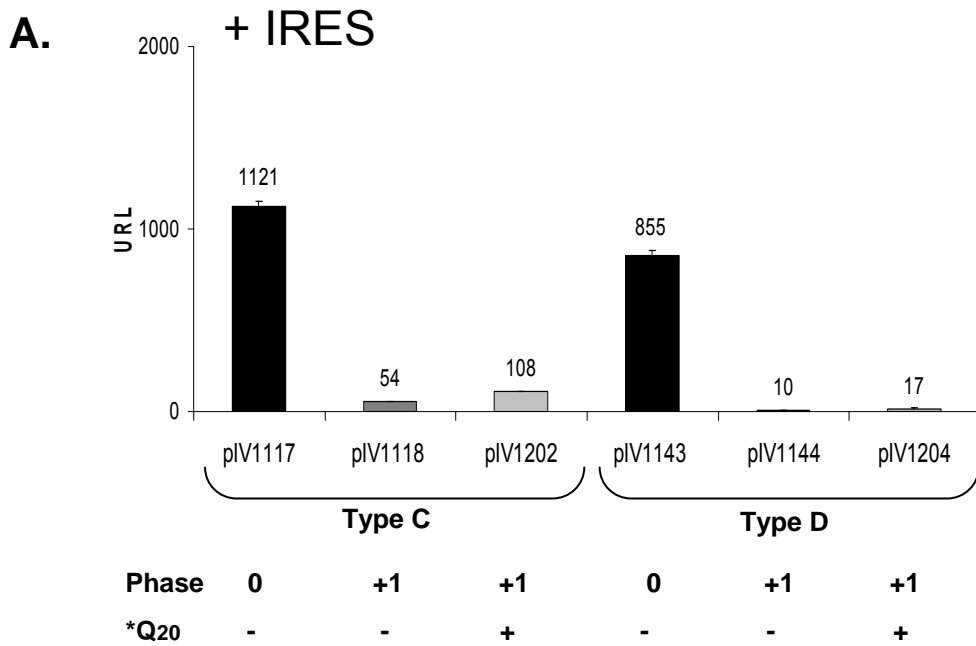


Figure 44. Etude de la traduction d'ARFP *in vitro* en lysats de réticulocytes de lapin.

La comparaison de la **figure 44** avec la figure 2 de la publication (p137) ne montre de différence que pour les constructions de type C *in vitro* et *ex vivo*. En effet, en présence de l'IRES la traduction en phase +1 est faible par rapport à celle de core alors qu'elles sont équivalentes en Huh-7. En absence de l'IRES, la traduction de core qui était largement inférieure à celle d'ARFP en Huh-7 devient majoritaire. Ceci tendrait à prouver que l'IRES du VHC est beaucoup plus efficace en absence de la coiffe. Les données obtenues en Huh-7 avec les constructions de type C seraient en grande partie expliquées par la présence de la coiffe qui encouragerait fortement la reconnaissance d'ⁱⁱ_{86/88}ARFP par « scanning ». Dans les constructions de type D, qui sont les plus proches du contexte viral, les résultats sont comparables *in vitro* et dans les cellules. Comme en Huh-7 (Fig. 2 p.137), la traduction d'ARFP est indépendante de l'IRES et est augmentée quand core n'est pas produite (*Q₂₀).

Ces résultats viennent renforcer les données obtenues avec les constructions de type D, en faveur de l'existence d'une traduction en phase +1 indépendante à la fois de l'IRES et de la coiffe.

IV.4 Influence des protéines virales sur la traduction

Les conditions utilisées dans notre étude ne sont pas les plus proches du contexte viral en raison de l'absence des autres protéines virales et du contexte génomique tronqué. Pour l'étude de la traduction en phase +1, la séquence la plus longue qui peut être insérée en amont du gène de la luciférase est celle de la protéine ARFP. Par contre, en faisant exprimer les autres protéines virales dans les cellules transfectées avec les plasmides en fusion à la luciférase, on se rapproche artificiellement d'un système proche de l'infection naturelle. Nous avons choisi d'utiliser des vecteurs viraux recombinants pour l'expression des autres protéines du VHC, ce qui permet l'expression du transgène d'intérêt dans toutes les cellules présentes. Ainsi, toutes les cellules transfectées exprimeront le transgène en même temps que la protéine de fusion à la luciférase.

IV.4.1 Influence des protéines structurales

L'influence des protéines structurales sur la traduction a été testée en utilisant un virus recombinant de la vaccine codant core-E1-E2 (vv205, barres hachurées). Un virus sauvage a servi de témoin de l'effet de l'infection (vvWT, barres pleines). L'expression de ces protéines

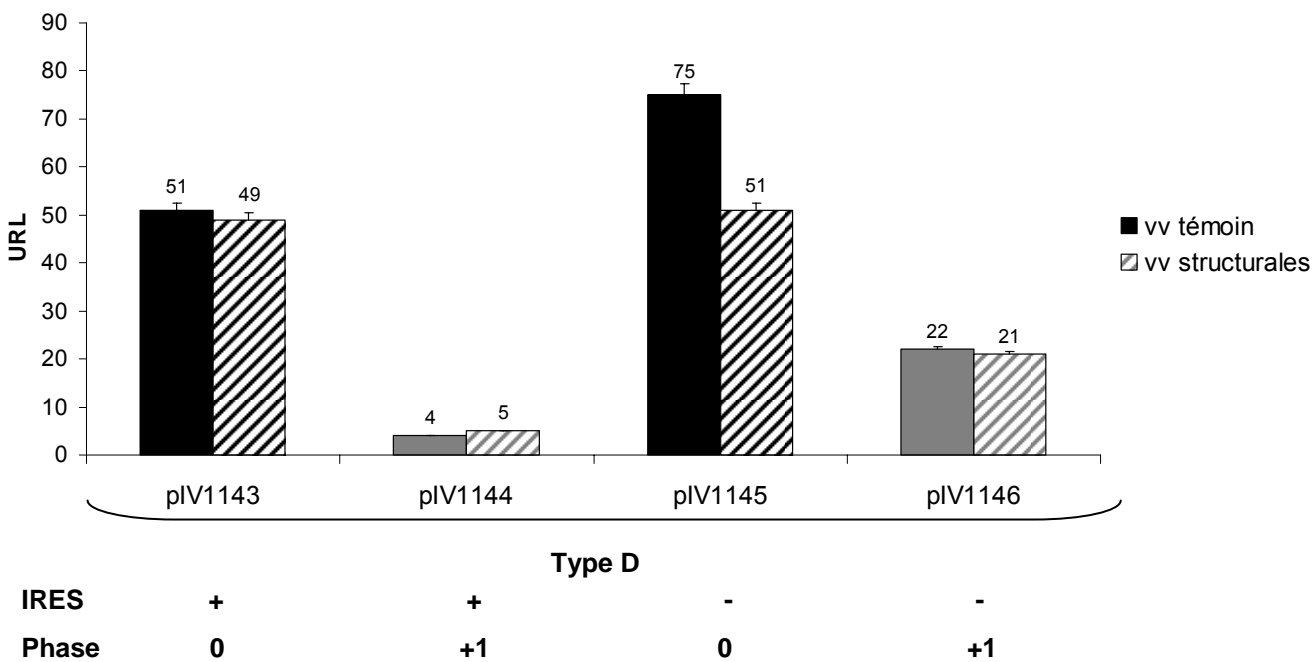


Figure 45. Influence des protéines structurales sur la traduction d'ARFP.

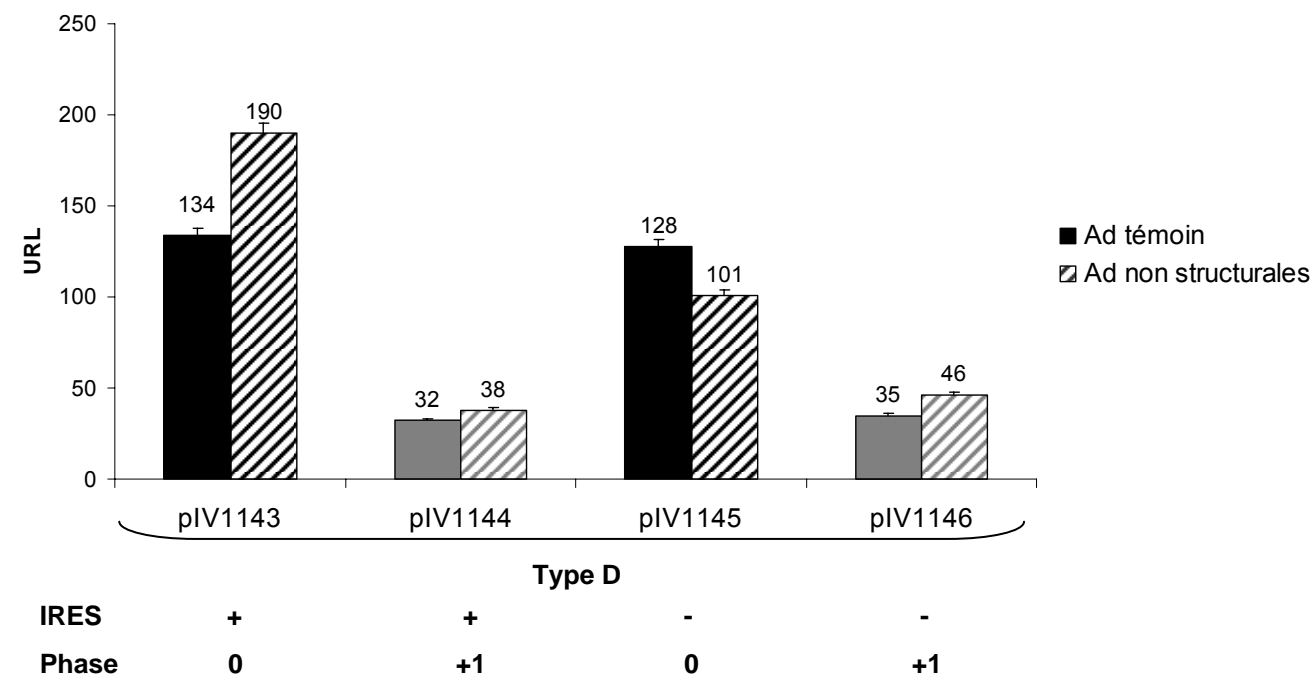


Figure 46. Influence des protéines non structurales sur la traduction d'ARFP.

n'a d'effet notable ni sur core, ni sur ARFP (**Fig. 45**). De plus, ces expériences montrent que la surexpression de core ne modifie pas la traduction en phase +1.

IV.4.2 Influence des protéines non structurales

En exprimant les protéines non structurales dans la cellule, on apporte théoriquement les composants viraux nécessaires à la formation du complexe de réplication. Ce contexte pourrait avoir une influence sur la traduction d'ARFP. Pour tester cette hypothèse, des cellules Huh-7 ont été transduites par un adénovirus codant toutes les protéines non structurales du VHC (Ad1053) (Dimitrova *et al.* 2003), puis ont été transfectées avec les constructions en fusion à la luciférase. Un adénovirus témoin codant les protéines non structurales en antisens (Ad1046) sert de témoin.

Aucune différence majeure n'est observée entre les cellules infectées par l'adénovirus témoin (barres pleines) et par l'adénovirus codant les protéines non structurales (barres hachurées) (**Fig. 46**). Ni la traduction de core ni celle d'ARFP ne sont modifiées, indiquant que dans notre système d'étude les protéines non structurales du VHC n'interviennent pas dans la traduction.

V. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude a apporté un nouvel éclairage sur la traduction de la protéine ARFP. Pour déterminer si cette protéine était synthétisée par décalage de cadre de lecture (fARFP) ou par initiation interne (ii₂₆ARFP ou ii_{86/88}ARFP), nous avons mis au point des constructions nous permettant de discriminer la part de ces divers sites d'initiation. Nous avons tout d'abord analysé l'impact de la séquence ARN sur les différents sites d'initiation de la protéine ARFP, puis identifié les produits de traduction en phase +1 correspondant aux valeurs luciférase mesurées. Dans notre système, la traduction de cette protéine est initiée au niveau de deux sites distincts situés dans la séquence d'ARFP au niveau des acides aminés 26 et 86/88. La forme majoritairement exprimée est ii_{86/88}ARFP, initiée au codon 86/88. Il s'agit d'une forme très courte d'environ 80 acides aminés pour le génotype 1a. Une autre forme, ii₂₆ARFP d'environ 140 acides aminés est synthétisée mais à des taux plus faibles à partir du codon 26 de la séquence d'ARFP. Ces deux formes partagent la même extrémité C-terminale. A l'inverse, nous n'avons à aucun moment été capables de détecter un événement de décalage de cadre de lecture aboutissant à la traduction de fARFP.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du contexte viral sur la traduction des deux protéines produites par initiation interne et nous avons démontré qu'elle est indépendante de l'IRES et de la région 3'NTR. De même, aucune modification n'est observée en présence des protéines structurales ou non structurales. Par contre, en absence de core la traduction en phase +1 est très fortement augmentée, et c'est l'expression d'ii_{86/88}ARFP qui est spécifiquement accrue. Des expériences de transcomplémentation utilisant un adénovirus recombinant codant core ont permis de montrer que c'est la présence de la protéine core qui inhibe la traduction d'ii_{86/88}ARFP. Alors que ces protéines partagent la même séquence, il existe donc un mécanisme de régulation de core sur ii_{86/88}ARFP.

L'ensemble de ces résultats est indépendant du type cellulaire choisi pour réaliser l'étude, la traduction en phase +1 étant même possible *in vitro*. D'autre part, en exprimant ARFP en fusion à la luciférase nous nous sommes affranchis du problème de stabilité de cette protéine. Nous avons ainsi pu éviter la toxicité liée à l'utilisation de MG-132 en culture cellulaire.

**E. FONCTION DE LA PROTEINE ARFP DANS LA CELLULE
HOTE**

La présence d'anticorps anti-ARFP dans le sérum des patients infectés est la seule indication de l'expression effective de cette protéine lors de l'infection virale (Komurian-Pradel *et al.* 2004). D'autres données ont été obtenues lors de travaux utilisant une protéine fARFP surproduite dans des cellules eucaryotes en culture. Ainsi, Roussel *et al.* (2003) ont montré que fARFP exprimée par un virus recombinant et étiquetée en C-terminal se localise au réticulum endoplasmique comme les autres protéines du VHC. La protéine, une fois exprimée dans la cellule, est très rapidement dégradée par la voie du protéasome. Sa demi-vie a été estimée à une dizaine de minutes mais peut être augmentée par utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132 (Xu *et al.* 2003).

Comme ARFP et core partagent la même séquence nucléotidique, certains des rôles attribués initialement à core pourraient finalement être imputables à ARFP. Une première étude a montré que contrairement à core ARFP ne module pas les activités de c-myc, hTERT et p53. Elle n'intervient pas non plus dans la voie TNF α aboutissant à l'apoptose, ni dans le cycle cellulaire. Par contre, ARFP réprime l'expression de p21 qui est la seule cible commune aux deux protéines actuellement connue (Basu *et al.* 2004). Mise à part cette dernière propriété, les fonctions majeures attribuées à core par le passé restent d'actualité. Ces observations montrent que ces deux protéines ont des fonctions bien distinctes.

Très récemment, une interaction entre fARFP et une protéine cellulaire appelée prefoldin 2 a été identifiée à la fois par double-hybride dans la levure et par des expériences *in vitro*. Prefoldin 2 est une sous-unité d'un complexe hexamérique à fonction de chaperone agissant au niveau de la distribution de l'actine et de la tubuline dans la cellule. Ce complexe est formé des prefoldin de 1 à 6. ARFP empêche la liaison entre prefoldin 1 et prefoldin 2, cette interaction aboutissant à une désorganisation du cytosquelette de tubuline (Tsao *et al.* 2006). Alors que la réplication du VHC n'est possible que dans une cellule dont le cytosquelette est intact (Bost *et al.* 2003), la liaison d'ARFP à la prefoldin 1, en dérangeant cette organisation, pourrait jouer un rôle de régulation en empêchant les cellules de répliquer le VHC à des taux trop élevés.

En dehors de ces pistes, le rôle d'ARFP dans le cycle viral et/ou dans la cellule hôte reste à découvrir, d'autant plus que tous les travaux s'intéressant au rôle de cette protéine dans la cellule hôte ont utilisé la forme fARFP. Notre étude ayant démontré que c'est la forme ii_{86/88}ARFP qui est largement majoritaire, les effets et les interactions décrits pour fARFP devront être confirmés pour la forme ii_{86/88}ARFP qui est effectivement traduite.

Lors de nos premiers travaux concernant le rôle d'ARFP, nous avons également utilisé la forme fARFP qui était la seule initialement décrite, puis vérifié les résultats obtenus en utilisant la protéine majoritaire ii_{86/88}ARFP. Notre étude de la fonction de la protéine ARFP a été réalisée par plusieurs approches pour tenter de comprendre le rôle de cette protéine à la fois dans le cycle viral et dans la cellule infectée. Dans un 1^{er} temps, nous avons recherché la **localisation subcellulaire d'ARFP** en l'exprimant en fusion au rapporteur EFGP. Puis, par criblage en double-hybride dans la levure, nous avons recherché **les protéines exprimées par la cellule hépatique susceptibles d'interagir avec ARFP** et nous avons commencé la caractérisation de ces interactions. L'**interaction de fARFP avec diverses protéines du VHC** a également été testée. En parallèle, nous avons construit différents outils nécessaires à l'étude d'ARFP : *i*) des **lignées stables** exprimant fARFP de façon inductible ou constitutive dans le but de tester l'effet ponctuel ou à long terme de la protéine dans la cellule, *ii*) **des anticorps** construits « à façon » dirigés contre la protéine et *iii*) des **adénovirus recombinants** codant les différentes formes de la protéine, utiles pour étudier l'expression de cytokines par la cellule en réponse à l'expression d'ARFP. Finalement, pour replacer nos travaux dans le contexte du virus, nous avons **muté les sites d'initiation de la protéine ARFP dans le clone infectieux JFH-1**. Les effets comparés de l'infection par ce clone muté et par le clone sauvage dans la cellule hépatique pourront nous renseigner sur la fonction d'ii_{86/88}ARFP dans le cycle viral et/ou dans la pathogénèse liée au VHC.

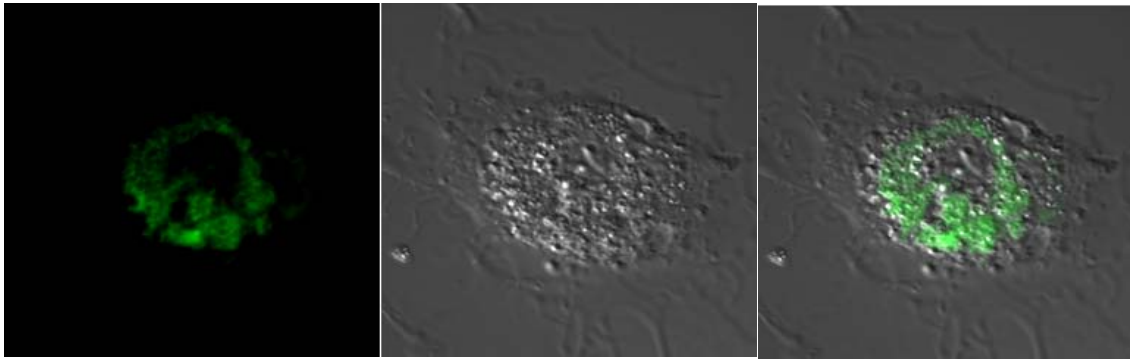
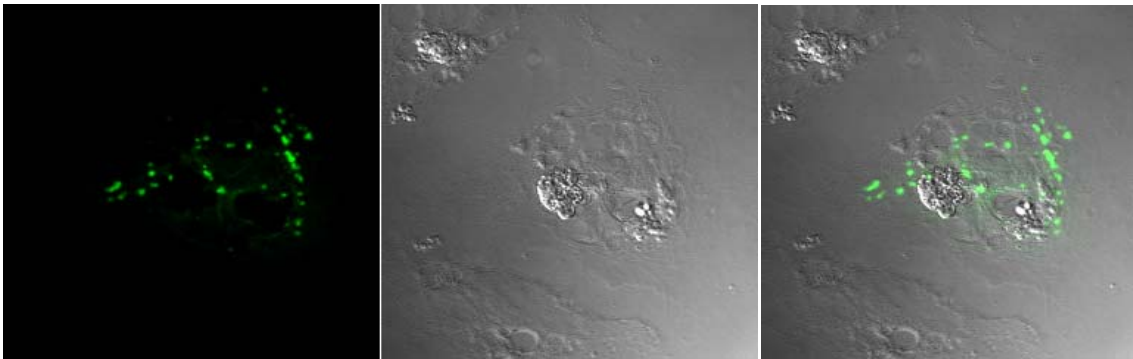
A.**B.****C.****D.**

Figure 47. Localisation des protéines fARFP-EGFP (A,B), core-EGFP (C), et EGFP seule (D) par microscopie confocale dans les cellules Huh-7 (X60).

I. Etude de la localisation d'ARFP dans la cellule

La première étape de notre étude de la fonction de la protéine ARFP a été de déterminer la localisation subcellulaire de cette protéine. Comme les protéines codées par le VHC sont toutes localisées à la membrane du RE, il nous paraissait intéressant de voir s'il en était de même pour ARFP. Comme nous ne disposions pas d'anticorps dirigés contre cette protéine à ce moment là, nous avons opté pour une expression en fusion à un gène rapporteur fluorescent. Cette stratégie permet de visualiser l'expression de la protéine directement dans la cellule vivante.

Nous avons tout d'abord construit une séquence fARFP artificielle, mimant un glissement de cadre de lecture +1 en insérant deux adénines supplémentaires au niveau du codon 11 de la séquence de core. La séquence fARFP « forcée » a été clonée en N- et C-terminal du gène EGFP codant une forme stable de la protéine verte fluorescente. Les plasmides résultants, pIV1073 et pIV1098 ont été transfectés dans différentes lignées cellulaires dont la lignée hépatocytaire Huh-7 et la lignée rénale HEK293. Des plasmides codant core en fusion avec EGFP ont également été construits. La présence d'un domaine transmembranaire dans la région C-terminale de la protéine (domaine D2, aa118 à aa172-181) rend défavorable la fusion d'un gène rapporteur à cette extrémité car elle empêche la localisation de core au RE. Core a donc été clonée en C-terminal de EGFP pour donner pIV1097. D'autres constructions contenant l'IRES ont également été réalisées mais ne conduisent qu'à une faible expression de fluorescence dans la cellule et à des observations peu ou pas exploitables.

Une faible fluorescence a été observée avec les constructions où fARFP est insérée en N-terminal de EGFP. A l'inverse, l'expression de EGFP-fARFP est forte dans la cellule et deux types de localisation coexistant dans la population de cellules transfectées ont été observés par microscopie confocale: nucléaire (**Fig. 47A**) ou cytoplasmique avec une forte concentration périnucléaire (**Fig. 47B**). L'expression des constructions codant la fusion EGFP-core présentent la localisation granulaire périnucléaire typique de core (**Fig. 47C**), et la protéine EGFP exprimée seule est retrouvée dans tous les compartiments cellulaires (**Fig. 47D**). Ces résultats sont en partielle opposition avec les données qui ont été publiées par deux groupes durant cette étude, et qui indiquent une localisation unique de fARFP à la membrane

du RE en présence de l'inhibiteur de protéasome MG-132 (Roussel *et al.* 2003; Xu *et al.* 2003). Ces localisations ont été établies par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs exprimés en fusion avec fARFP et sont identiques que l'épitope soit situé en N-terminal ou en C-terminal de fARFP. Nos résultats pourraient être expliqués par une modification de la localisation due à la fusion fARFP-EGFP. En effet, une étude a montré que la fusion en N-terminal de la protéine fluorescente était impliquée dans le blocage de séquences signal associées à l'import dans la mitochondrie ou dans le RE (Pepperkok *et al.* 2001). Nos fusions sont réalisées en C-terminal de EGFP mais nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse d'une perturbation de l'adressage de la protéine au RE. Une autre différence aurait pu être l'absence de l'inhibiteur de protéasome MG-132 dans nos expériences. Toutefois, des observations complémentaires en présence de cette molécule n'ont pas montré de changement notable dans la localisation de fARFP.

La question de la localisation s'est à nouveau posée quand nous avons démontré que la forme ii_{86/88}ARFP est la forme majoritairement traduite à partir de la séquence ARF. Nous avons alors cloné la séquence de cette forme courte en aval du gène EGFP et transfecté cette construction dans la lignée cellulaire Huh-7. La distribution intracellulaire de la protéine de fusion EGFP-ii_{86/88}ARFP est la même que celle de la protéine EGFP exprimée seule, c'est-à-dire qu'elle est retrouvée dans tous les compartiments sans localisation préférentielle, ceci en absence ou en présence de MG-132.

Pour éviter un éventuel biais lié à la présence du marqueur EGFP, un autre plasmide codant ii_{86/88}ARFP en fusion à l'épitope HA a été construit. L'optimisation des conditions de détection par immunofluorescence de l'épitope HA est en cours. La comparaison des observations obtenues avec ces deux marqueurs nous permettront, nous l'espérons, de conclure quant à la localisation réelle d'ii_{86/88}ARFP.

II. Recherche d'interactants d'ARFP par double-hybride dans la levure

II.1 Principe du criblage d'une banque d'ADNc par double-hybride

Le criblage par double-hybride est une méthode sensible de mise en évidence d'interactions mêmes faibles ou transitoires, qui ne sont pas forcément détectables par des techniques biochimiques mais qui sont essentielles pour le fonctionnement de systèmes biologiques. Cette technique permet de tester dans un système biologique simple, la levure, et de façon simultanée les interactions entre une protéine hameçon, la protéine d'intérêt, et les protéines codées par une banque d'ADNc choisie. Cette approche est basée sur le mécanisme de transcription des gènes cibles des facteurs de transcription eucaryotes. Les facteurs de transcription eucaryotes possèdent au moins deux domaines physiquement séparables, le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA binding domain) qui leur permet de se fixer sur une séquence ADN spécifique de leurs gènes cibles, et un domaine d'activation de la transcription de ces gènes (AD pour activating domain). Les domaines DBD et AD sont séparés à la fois en structure et en fonction, mais doivent être proches pour induire l'activation de la transcription du gène cible. C'est cette caractéristique qui est exploitée dans le système double hybride qui utilise les domaines AD et DBD de la protéine GAL-4, en fusion avec la banque d'ADNc pour le domaine AD et avec la protéine d'intérêt pour le domaine DBD.

La protéine GAL-4 est codée par le génome de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et active naturellement la transcription des gènes *gal-1* et *gal-10* par interaction de son domaine DBD avec une séquence spécifique appelée UAS (GAL-4 responsive upstream activating sequence), et par l'activation de la transcription des gènes par son domaine AD. Dans le test double-hybride, les phases codantes des gènes *gal-1* et *gal-10* sont remplacées par d'autres gènes métaboliques qui sont des gènes rapporteurs et dont la transcription est contrôlée par la séquence UAS.

Lors du criblage, la protéine hameçon est exprimée en fusion avec le domaine DBD et les ADNc présents dans la banque sont fusionnés au domaine AD. La protéine hameçon se fixe à la séquence UAS par le domaine DBD, mais est en général incapable d'activer la

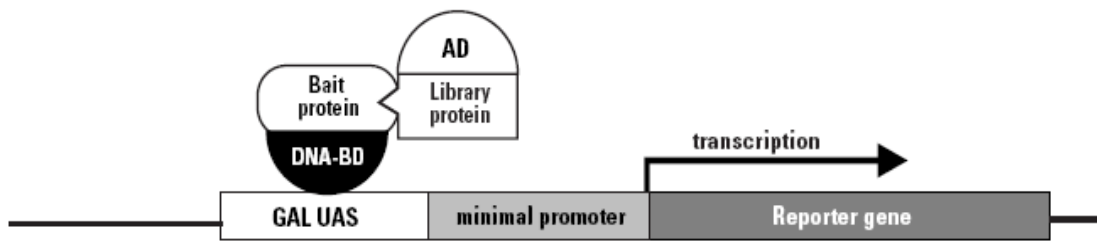


Figure 48. Principe du double hybride. GAL-4 est un facteur de transcription de la levure qui contrôle les gènes responsables du métabolisme du galactose. La liaison de GAL-4 à l'UAS entraîne l'activation de la transcription par un promoteur situé en aval. En remplaçant le gène sauvage par d'autres gènes métaboliques sous contrôle de l'UAS, on obtient des souches de levure qui changent de phénotype quand GAL-4 est activé. Dans la technique de double-hybride, l'activation de GAL-4 correspond au rapprochement des domaines DBD (DNA-BD) et AD par l'interaction de la protéine hameçon avec la protéine cible.

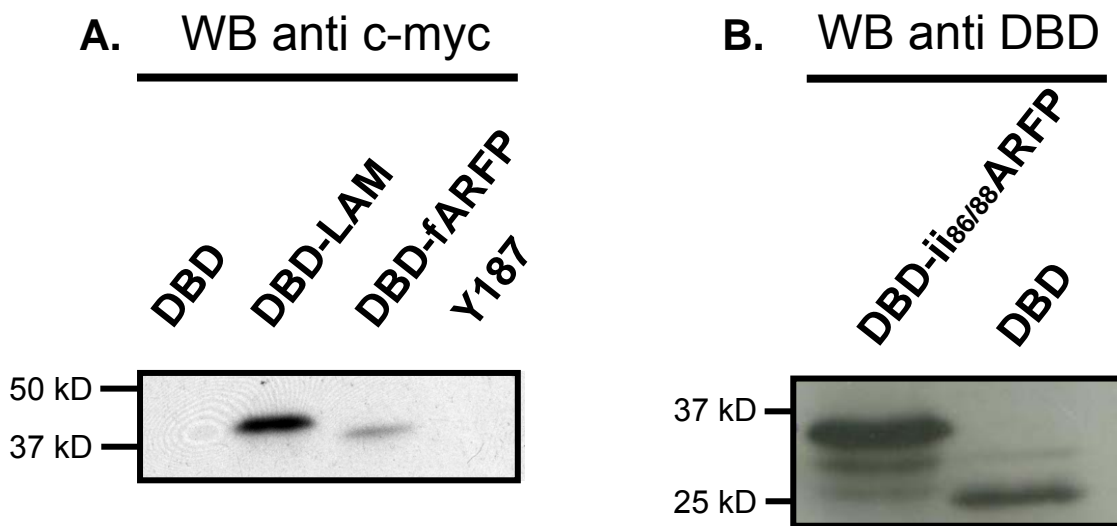


Figure 49. Détection des protéines de fusion DBD-fARFP (A) et DBD-ii_{86/88}ARFP (B) qui sont révélées avec (A) un anticorps dirigé contre c-myc, un épitope inséré à la jonction entre DBD et la protéine d'intérêt, (B) un anticorps dirigé contre le domaine DBD de GAL-4. Les protéines fARFP ou ii_{86/88}ARFP en fusion avec DBD ou le domaine DBD seul ont des tailles respectives de 41, 33 et 25 kD. Y187 correspond à un extrait de la souche de levure non transformée, LAM est un témoin négatif d'interaction (fusion DBD-laminine).

transcription. Si elle interagit avec une des protéines codées par la banque (protéine proie) elle-même en fusion avec AD, leurs domaines AD et DBD seront physiquement rapprochés et la transcription du gène cible sera activée (**Fig. 48**). La souche de levure choisie pour le criblage exprime comme gènes rapporteurs des gènes métaboliques marqueurs placés sous le contrôle de la séquence UAS. Dans des conditions de croissance sélectives (milieu dépourvu du marqueur), seules les levures dont le gène rapporteur est exprimé pourront pousser. Si la levure pousse, c'est que la transcription du gène marqueur a été activée par une interaction entre la protéine hameçon et une protéine proie de la banque, rapprochant les domaines AD et DBD. Les marqueurs de sélection *HIS1*, *ADE1*, *lacZ*, *MEL1* sont présents dans les souches utilisées lors de notre étude (**Fig. 51**). Après plusieurs jours de culture, seuls sont considérés comme candidats interactants les clones capables de pousser sur un milieu sélectif dépourvu de tous les marqueurs métaboliques codés par les gènes dépendants de UAS et par les marqueurs d'auxotrophie des vecteurs d'expression.

II.2 Recherche d'interactants de fARFP

II.2.1 Expression de fARFP dans la levure

Nous avons recherché les interactants de fARFP par double-hybride dans la levure. La première étape a été d'obtenir la séquence de fARFP « forcée », résultant de l'insertion de deux nucléotides mimant le glissement de cadre de lecture +1. La séquence de cette protéine a ensuite été clonée dans le vecteur pGBKT7 en fusion avec le domaine DBD de GAL-4. Le plasmide résultant est appelé pIV1067. Avant le criblage, pIV1067 a été transformé dans la souche de levure Y187. Nous avons vérifié *i*) que la protéine est bien exprimée par western blot (**Fig. 49A**), *ii*) qu'elle n'est pas toxique en comparant le taux de croissance des levures transformées par fARFP ou par le vecteur vide et *iii*) qu'elle n'a pas par elle-même des propriétés activatrices en étalant les levures transformées par pIV1067 sur un milieu sélectif (-Trp/-Leu/-His/-Ade). L'absence de pousse indique que la protéine fARFP ne contient pas de domaine d'activation de la transcription qui lui permettrait d'activer par elle-même la transcription des gènes rapporteurs.

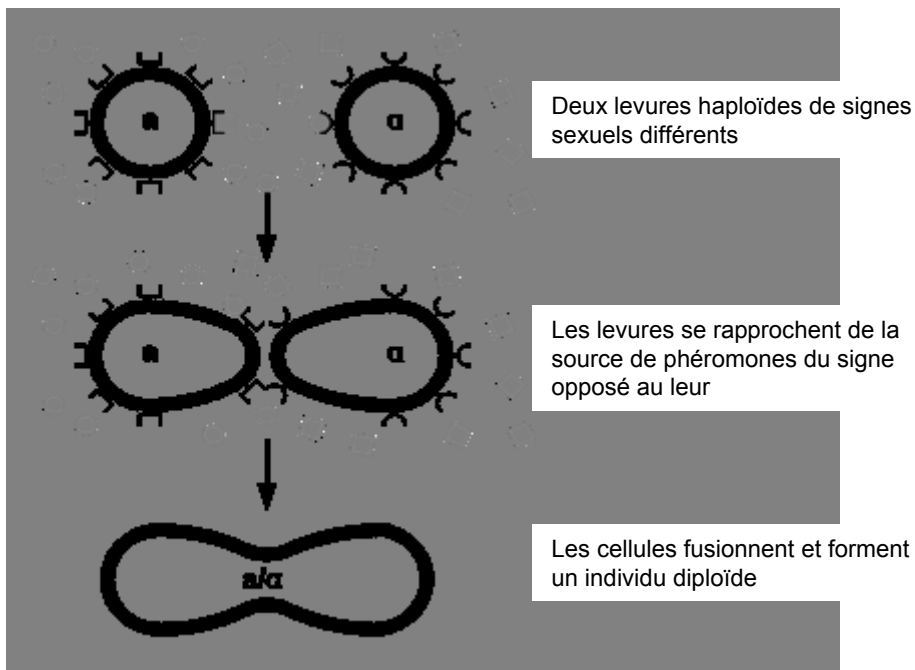


Figure 50. Principe du mating

Gènes rapporteurs de AH109 (contenant la banque)

GAL1 UAS	GAL1 TATA	HIS3
GAL2 UAS	GAL2 TATA	ADE2
MEL1 UAS	MEL1 TATA	lacZ
MEL1 UAS	MEL1 TATA	MEL1

Gènes rapporteurs de Y187 (partenaire de mating)

GAL1 UAS	GAL1 TATA	lacZ
MEL1 UAS	MEL1 TATA	MEL1

Figure 51. Gènes rapporteurs des souches de levure AH109 et Y187. AH109 contient les marqueurs auxotrophiques ADE2 et HIS3, les gène lacZ et MEL1 qui codent respectivement la β - et l' α -galactosidase. Les gènes rapporteurs sont sous le contrôle de séquences UAS de GAL-4. Y187 contient les marqueurs lacZ et MEL1.

II.2.2 Criblage de la banque d'ADNc

II.2.2.1 Banque d'ADNc

La banque d'ADNc que nous avons utilisée est une banque commerciale d'ADNc de foie humain provenant d'un adulte caucasien de 40 ans. Les ADNc sont clonés dans le vecteur pACT2 en fusion avec le domaine AD et la banque est prétransformée dans la souche de levure AH109 (Matchmaker liver pretransformed library, Clontech). L'interaction de fARFP avec une protéine codée par cette banque d'ADNc a ensuite été testée par criblage en double-hybride. L'utilisation d'une banque commerciale préalablement transformée garantit une représentation optimale de chaque ADNc contenu dans la banque.

II.2.2.2 Principe du mating

Le criblage se fait non pas par co-transformation des deux types de plasmides dans une seule souche de levure mais par mise en co-culture des deux souches AH109 et Y187, chacune transformée au préalable par une construction donnée. Ces deux souches sont haploïdes et de signes sexuels opposés *MATa* et *MATα*. Les caractères *MATa* et *MATα* sont attribués en fonction du type de phéromone sécrété par la levure. Quand deux souches de levure de signes sexuels opposés sont mises en présence, chacune reconnaît la phéromone sécrétée par l'autre et elles fusionnent en formant un clone diploïde (**Fig. 50**). L'ensemble de ce processus est appelé « mating ». Cette stratégie de criblage permet d'éviter les étapes de co-transformation, conduisant à un gain de temps considérable et augmentant le nombre de double-transformants obtenus.

II.2.2.3 Souches de levures utilisées

Les gènes marqueurs des souches AH109 et Y187 sont présentés dans la **figure 51**. AH109 permet l'expression des marqueurs *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* et *MEL1*. *HIS3* permet la synthèse de l'histidine (His), *ADE2* de l'adénine (Ade), *lacZ* (β -galactosidase) et *MEL1* (α -galactosidase). La souche Y187 porte les marqueurs *MEL1* et *lacZ*. Ces marqueurs sont sous le contrôle de séquences UAS hétérogènes qui dirigent chacune l'activation d'un promoteur de transcription différent. Ces promoteurs sont indépendants et n'ont en commun que la courte séquence UAS qui permet la fixation spécifique de GAL-4. De ce fait, l'utilisation de ces souches permet d'éviter les faux positifs liés aux protéines interagissant directement avec les séquences bordant le site de fixation du domaine DBD de GAL-4.

Souche Y187 transformée par pIV1067

Souche Y187 : signe a
Milieu sélectif : -Trp

**Souche AH109 commerciale
prétransformée par une banque d'ADNc
de foie humain**

Souche AH109 : de signe α
Milieu sélectif : -Leu

Mise en culture des deux souches : «mating»

Levures diploïdes : signe a/α
Milieu sélectif : -Trp/-Leu

5.10⁶ clones criblés

Etagement sur 50 grosses boîtes
Milieu sélectif : -Leu/-Trp/-His/-Ade + X- α -Gal
3 cycles de sélection

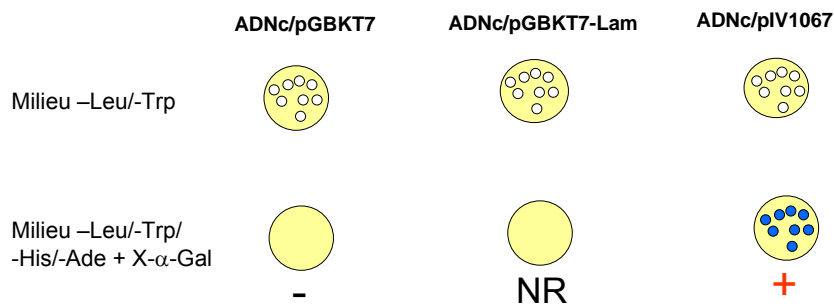
47 candidats

Analyse des candidats

Élimination des doublons

35 candidats

**Analyse des candidats :
vrais ou faux positifs?**



13 candidats

Analyse des séquences

6 clones

Figure 52. Criblage d'une banque d'ADNc de foie humain pour la recherche d'interactants de la protéine fARFP en double-hybride dans la levure.

II.2.2.4 Criblage de la banque d'ADNc par fARFP

Après mating de la souche Y187 transformée par le plasmide codant fARFP avec la souche AH109 prétransformée par la banque d'ADNc de foie humain, les levures sont étalées d'une part sur milieu –Leu/-Trp permettant d'estimer le nombre de co-transformants et donc l'efficacité du mating, et d'autre part sur milieu sélectif stringent dépourvu de tous les marqueurs métaboliques (–Leu/-Trp/-His/-Ade) (**Fig. 52**). Nous avons obtenu une efficacité de 5×10^6 clones criblés. Cette valeur nous permet de continuer le criblage avec confiance car elle assure une bonne représentation de tous les ADNc de la banque. Après deux semaines de croissance sur milieu sélectif –Leu/-Trp/-His/-Ade, 56 clones ont été retenus. Ces clones ont ensuite été repiqués sur milieu sélectif en présence d'X- α -Gal afin de tester l'activation du gène *MEL1*. Ce gène rapporteur permet de s'affranchir dans un premier temps du dosage de l'activité β -galactosidase par voie enzymatique, car les colonies deviennent bleues lors de leur croissance et peuvent être repiquées sans souci. Tous les clones virant au bleu sont considérés comme clones candidats. Trois repiquages successifs en milieu sélectif contenant de l' X- α -Gal ont permis d'écarter 9 clones dont la croissance a été considérée comme trop lente.

A l'issue de ces repiquages, l'ADN des colonies a été extrait et utilisé pour transformer des bactéries afin de procéder à une première analyse des ADNc sélectionnés. Les profils de restriction de ces ADNc nous ont permis d'éliminer 12 doublons.

II.2.2.5 Spécificité de l'interaction dans la levure

Pour confirmer les interactions observées, chaque clone contenant un ADNc de la banque sélectionné est co-transformé avec trois types de plasmides : le clone fARFP-DBD, le vecteur vide DBD ou un contrôle négatif laminine-DBD. Si l'interaction observée est spécifique, seules les levures contenant fARFP-DBD et l'ADNc sélectionné doivent être capables de pousser après étalement sur milieu sélectif. Par contre, si certains clones co-transformés avec le vecteur vide DBD ou avec le témoin laminine-DBD poussent, l'interaction sera considérée comme non spécifique et le clone non retenu (**Fig. 52**). A l'issue de ce test, 13 clones sur les 35 ont été retenus.

Dans un 2^{ème} temps, les co-transformations obtenues avec le plasmide codant fARFP-DBD et chacun des candidats sont testées pour leur capacité à interagir dans un contexte inversé. Ceci est réalisé en clonant cette fois l'ADNc de chaque candidat interagissant en fusion avec le domaine DBD de Gal-4, et fARFP en fusion avec le domaine AD de Gal-4.

- Metallothionein 1G
- ATF-5
- Autophagy 5-like protein 5 (APG)
- Clone 25 inconnu
- Angiotensine II receptor like 1
- Apolipoprotéine H (B2 glycoprotein I)
- Clone 34 inconnu

Figure 53. Récapitulatif des candidats interactants de fARFP identifiés par double-hybride dans la levure.

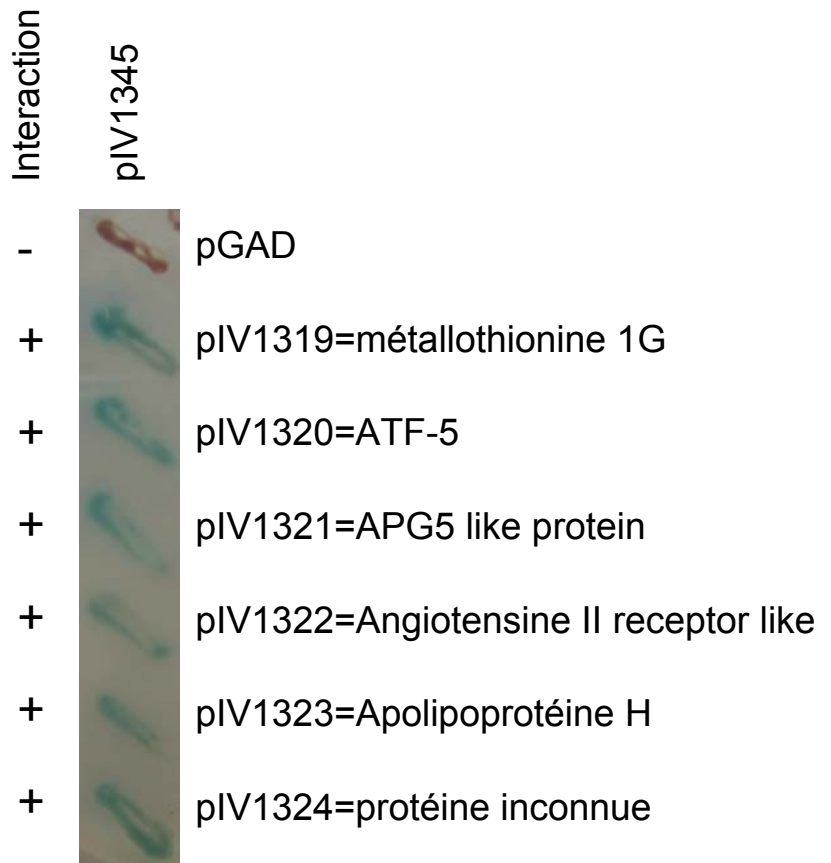


Figure 54. Détection de l'interaction entre ii86/88ARFP et les candidats sélectionnés. Ces derniers sont issus du criblage de la banque d'ADNc de foie par fARFP, sur milieu QDO (-Trp/-Leu/-His/-Ade) en présence d'X- α -Gal.

Tous les candidats retenus précédemment ont été capables d'interagir dans cette configuration.

II.2.2.6 Identification des interactants

Les ADNc des clones retenus ont ensuite été séquencés et identifiés par interrogation des banques de données (BLAST). A ce stade, certains clones ont été éliminés car l'ADN séquencé ne contient pas de phase ouverte de lecture, indiquant que le partenaire protéique est un artefact de construction de la banque (fusion de AD avec l'ADNc codant une protéine). A l'issue de cette analyse, les 6 clones présentés en **figure 53** ont été retenus. Parmi eux, deux candidats nous ont semblé intéressants. Le premier est la métallothionine-G, qui est surexprimée dans le foie et dont l'évolution au cours de l'infection par le VHC a déjà été documentée (Carrera *et al.* 2003). Le deuxième candidat est l'Apolipoprotéine H, qui est impliquée dans le métabolisme lipidique. Ceci en fait un candidat très intéressant, du fait des étroites interactions entre le métabolisme lipidique et l'infection VHC (Kapadia and Chisari 2005).

II.3 Validation des interactants avec $ii_{86/88}$ ARFP

L'étude de la traduction d'ARFP a montré qu' $ii_{86/88}$ ARFP est la forme majoritairement exprimée de la protéine. Les interactions identifiées avec fARFP devaient donc être validées pour cette forme plus courte. Pour cela, nous avons cloné la séquence d' $ii_{86/88}$ ARFP en fusion avec les domaines AD et DBD, produisant les vecteurs pIV1344 et pIV1345 respectivement. Après avoir vérifié l'expression de la protéine dans la levure (**Fig. 49B**) et son innocuité sur la croissance des levures et sur la transcription des gènes marqueurs, pIV1345 a été co-transformé dans la souche AH109 avec les candidats interactants exprimés dans pACT-2. Toutes les interactions ont pu être confirmées sur milieu sélectif en présence d' $X-\alpha$ -Gal (**Fig. 54**). Les mêmes résultats ont été obtenus pour le test d'interaction en sens inverse, entre pIV1344 et les ADNc des candidats en fusion avec le domaine DBD. Ceci signifie que tous les candidats interactants identifiés de fARFP interagissent dans la partie C-terminale de la protéine, qui correspond à $ii_{86/88}$ ARFP. Les interactants identifiés sont donc des interactants d' $ii_{86/88}$ ARFP.

II.4 Caractérisation des interactions

Pour valider les résultats obtenus en double-hybride, les interactions doivent ensuite être confirmées par des expériences à la fois *in vitro* et en lignée cellulaire.

II.4.1 *In vitro*

Les interactions ont été dans un premier temps testées par précipitation à la GST-Glutathione sépharose. La séquence codant ii_{86/88}ARFP a été clonée en fusion avec le gène de la GST générant pIV1348. Ce plasmide a été transformé dans la souche bactérienne BL-21, une souche modifiée qui permet la production de protéines même toxiques. La protéine de fusion produite GST-ii_{86/88}ARFP a été purifiée sur des billes de glutathione sépharose. En parallèle, les candidats interactants ont été transcrits et traduits *in vitro* dans un système de réticulocytes de lapin en présence de [³⁵S]Méthionine. Ces interactants radiomarqués sont incubés avec la protéine de fusion GST-ii_{86/88}ARFP fixée aux billes de glutathione sépharose. Après plusieurs cycles de lavages, les billes sont récupérées et chauffées, libérant les protéines interagissant avec ii_{86/88}ARFP. Ces dernières sont ensuite séparées sur gel Tris-glycine et visualisées après quelques jours d'exposition. Jusqu'à présent, nous n'avons pas réussi à visualiser *in vitro* des interactions spécifiques entre ii_{86/88}ARFP et les interactants issus du double-hybride.

II.4.2 *Co-localisation dans la cellule*

Les séquences des candidats interactants et de fARFP ont été clonées dans un vecteur d'expression eucaryote en fusion aux gènes rapporteurs EGFP et DsRed respectivement. Ces plasmides ont été transfectés deux à deux dans des cellules Huh-7, et la superposition de l'expression des protéines fluorescentes rouges et vertes donne un signal jaune en cas de co-localisation. Les résultats de ces expériences ont été observés par microscopie confocale et n'ont pas été concluants. Comme nous avons montré qu'ii_{86/88}ARFP est la forme majoritaire d'ARFP, et que cette protéine et fARFP ont des localisations très différentes dans la cellule, les expériences de co-localisation seront recommencées avec ii_{86/88}ARFP en fusion à DsRed.

II.5 Test de l'interaction entre fARFP et les autres protéines du VHC

II.5.1 Test de l'homodimérisation de fARFP

Pour le criblage double-hybride, nous avons construit des vecteurs exprimant fARFP en fusion soit avec le domaine DBD (pIV1067), soit avec le domaine AD (pIV1065). La co-transformation de ces deux vecteurs dans la levure nous permet de tester la dimérisation de la protéine fARFP. Dans ce cas, fARFP est à la fois l'hameçon et la proie de l'essai. L'étalement des levures co-transformées par les deux plasmides sur milieu sélectif n'a pas donné de clone positif, indiquant qu'à l'inverse de la plupart des protéines du VHC la protéine fARFP ne dimérise pas.

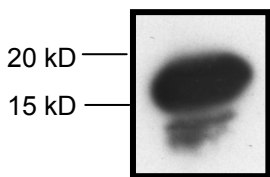
II.5.2 Test de l'interaction de fARFP avec la protéine core

Les traductions des protéines fARFP et core étant étroitement liées, nous avons ensuite testé une interaction entre ces deux protéines. Nous avons tout d'abord construit un plasmide exprimant la protéine core entière en fusion au domaine AD de GAL-4 (pIV1279). pIV1067 et pIV1279 ont ensuite été co-transformés dans la souche AH109, et étalés sur milieu sélectif. L'absence de clone sur boîte indique que core et fARFP n'interagissent pas.

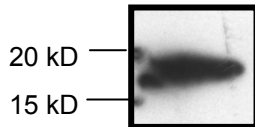
II.5.3 Test de l'interaction de fARFP avec les protéines non structurales

Nous disposons au laboratoire de plasmides codant chaque protéine non structurale en fusion au domaine AD ou DBD pour l'expression dans la levure. Ces plasmides ont été construits lors d'une étude précédente (Dimitrova *et al.* 2003). Chaque vecteur a été co-transformé dans la levure avec le plasmide codant fARFP dans la fusion correspondante. Aucun clone n'a poussé après étalement sur milieu sélectif. En conséquence, dans le système double-hybride, fARFP n'interagit avec aucune des protéines non structurales du VHC.

A. WB anti fARFP
222796



B. WB anti fARFP
222801



C. WB anti fARFP
2E10C1

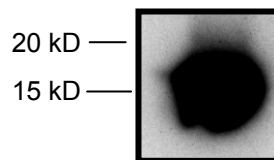


Figure 55. Test des anticorps produits contre la protéine fARFP. (A et B) Les deux anticorps que nous avons fait produire (222796 et 222801, A et B) et (C) l'anticorps monoclonal fourni par Biomérieux (2E10C1) ont été utilisés pour révéler une forme surproduite et purifiée de la protéine fARFP de génotype 1a (Biomérieux, Lyon).

III. Outils construits pour l'étude de la fonction d'ARFP

Au cours de l'étude de la protéine ARFP, nous avons également construit différents outils qui devaient nous permettre de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le cycle du VHC. Parmi ceux-ci, *i)* deux lignées stables exprimant la protéine fARFP de façon constitutive ou inductible, *ii)* différents adénovirus recombinants et *iii)* un clone JFH-1 muté dans les sites d'initiation de la traduction d'ARFP. Nous avons également fait produire un anticorps dirigé contre un peptide de fARFP dans le but de pouvoir détecter spécifiquement cette protéine. Cette dernière partie rend compte de ces travaux.

III.1 Production d'anticorps anti-fARFP

Une des limites principales de l'étude de la protéine fARFP a été pendant longtemps l'absence d'anticorps spécifiques permettant de la détecter que ce soit en western blot ou lors d'expériences d'immunoprécipitation ou d'immunofluorescence. Pour remédier à ce problème, nous avons fait synthétiser un peptide et produire « à façon » un anticorps dirigé contre ce peptide auprès de la société Neosystem. La région la plus antigénique de la protéine a été déterminée (aa63 à aa77, VLSLSPRHVGPRAGPG). Le peptide correspondant est synthétisé puis injecté à des lapins dont le sérum est ensuite récolté. Deux sera de lapins ont été obtenus et testés par western blot en utilisant une protéine fARFP purifiée provenant du laboratoire du Dr Parhanos-Baccala (Biomérieux, Lyon) (**Fig. 55A, B**). Une protéine de 17 kD, la taille de fARFP, est détectée par les deux sera de lapin. Ces anticorps ont par la suite été utilisés dans les diverses expériences menées sur la protéine fARFP.

En parallèle, un anticorps monoclonal dirigé contre fARFP nous a été fourni par le laboratoire du Dr Parhanos-Baccala (Biomérieux, Lyon). Cet anticorps détecte de la même façon que les anticorps précédents la protéine de 17 kD (**Fig. 55C**). Nous disposons donc de 3 anticorps pour détecter la protéine. L'anticorps purifié du laboratoire Biomérieux était le plus sensible pour détecter par western blot cette protéine qui est exprimée à de faibles taux dans la cellule.

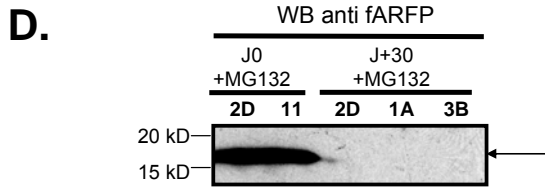
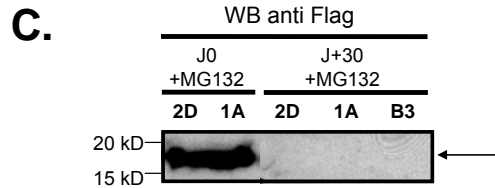
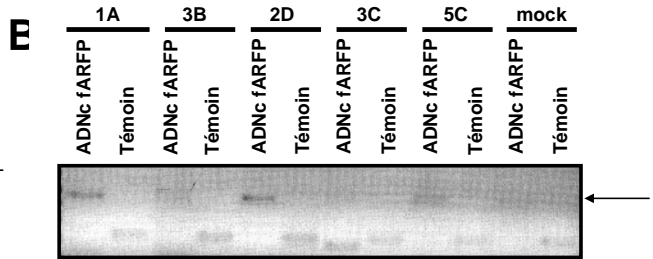
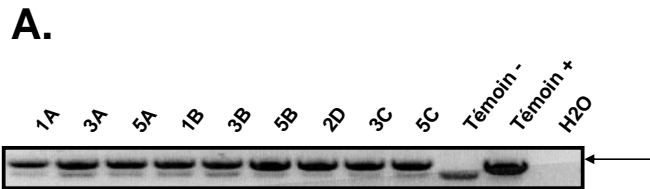


Figure 56. Caractérisation de lignées stables exprimant fARFP de façon constitutive. (A) Détection de la séquence de fARFP dans l'ADN génomique de chaque clone cellulaire sélectionné. Les chiffres et lettre réfèrent aux clones cellulaires, le témoin négatif est obtenu à partir d'un lysat de Huh-7 transfectées avec pCi-neo vide. (B) Mise en évidence des transcrits de fARFP par RT-PCR. Les pistes témoin correspondent à l'amplification de l'ADNc de GAPDH et constituent le témoin positif de l'expérience. Le mock est obtenu à partir d'ARN extrait de lysats de Huh-7 transfectées avec pCi-neo (C) Détection de la protéine au cours du temps avec un anticorps anti- Flag ou anti fARFP (2E10C1, Biomérieux, Lyon).

III.2 Lignée stable exprimant fARFP de façon constitutive

Dans un premier temps, nous souhaitions étudier les effets à long terme de l'expression de fARFP dans la cellule. Pour cela, nous avons choisi de sélectionner des lignées exprimant de manière constitutive la protéine fARFP. Nous avons cloné la séquence de fARFP « forcée » dans le vecteur pCi-neo en fusion à l'épitope marqueur Flag. Ce plasmide est appelé pIV1108 et code également le gène de résistance à la néomycine. Après transfection dans la lignée cellulaire Huh-7, les cellules ayant intégré le plasmide dans leur génome sont sélectionnées par addition de G418 dans le milieu. Le G418 est l'antibiotique adapté à la sélection des vecteurs portant la résistance à la néomycine dans les cellules eucaryotes. Après plusieurs semaines de sélection, les clones résistants sont isolés et amplifiés. L'incorporation du plasmide est vérifiée par PCR après extraction de l'ADN génomique des cellules dans les différents clones obtenus. On voit sur la **figure 56A** que tous les clones obtenus sous pression de sélection antibiotique ont intégré le gène fARFP. La transcription du gène est détectée par RT-PCR. Sur l'exemple présenté sur la **figure 56B**, on observe que les clones 1A, 3B, 2D et 5C produisent de l'ARN alors que 3C n'en produit pas bien que l'ADN soit présent (comparer avec Fig. 56A). Finalement, l'expression de la protéine fARFP est détectée dans les lysats par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope Flag ou contre fARFP (**Fig. 56 C, D**).

Plusieurs clones positifs ont été obtenus et nous possédions ainsi un outil de choix pour étudier l'effet de l'expression de la protéine fARFP dans la cellule. Toutefois, notre déception a été grande lorsqu'après repiquages nous avons remarqué que l'expression de fARFP n'était plus détectable par western blot (comparer les pistes J0 et J+30 de la figure 56C, D). Cette observation a été faite au cours de 3 essais de sélection différents. Après analyse des clones, il s'avère que l'ADN génomique est toujours présent mais que l'ARN n'est plus produit. Une explication pourrait être la sélection positive de clones altérés dans le promoteur de fARFP.

III.3 Lignée stable exprimant fARFP de façon inductible

Pour contourner le problème de la perte d'expression de fARFP dans les lignées et étudier l'action ponctuelle de la protéine dans la cellule, des lignées cellulaires exprimant la protéine de façon inductible ont alors été construites. Pour cela, la séquence de fARFP

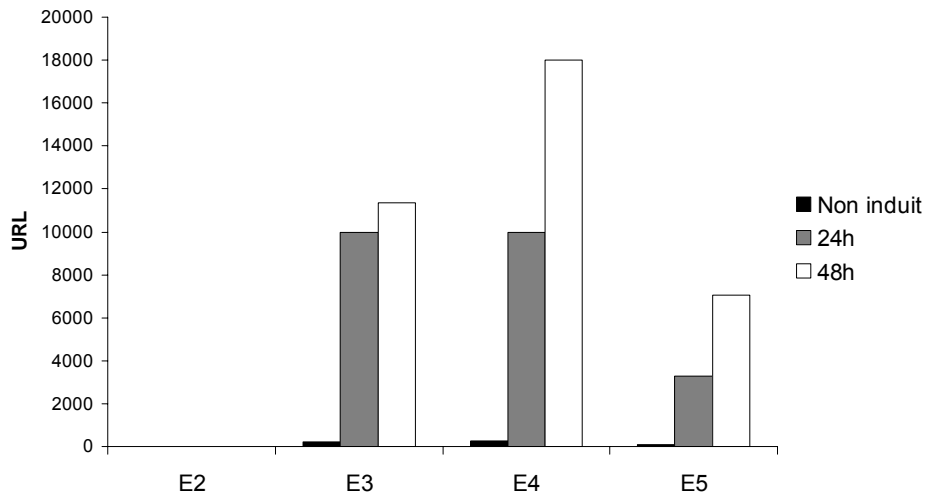


Figure 57. Dosage de la luciférase en réponse à l'addition de tétracycline dans les lignées stables inductibles, 24h et 48h après induction.

« forcée » a été insérée dans le plasmide pBI-L sous le contrôle du promoteur bidirectionnel P_{bi-1} qui dirige la transcription du gène d'intérêt dans une direction, et celle du gène marqueur luciférase dans l'autre. Ce promoteur est réprimé dans des conditions normales de culture et activé par la présence de la tétracycline. Le plasmide ainsi construit est appelé pIV1093. Il est co-transfecté avec un plasmide portant le gène de résistance à l'hygromycine (pHyg) dans les cellules HEK293 Tet-on. Ces cellules sont modifiées et codent constitutivement un répresseur qui se fixe sur la séquence TRE (tetracyclin response element) et empêche la transcription à partir du promoteur P_{bi-1} en absence de tétracycline. L'addition de doxycycline, l'antibiotique correspondant à la tétracycline adapté à la culture cellulaire, déplace le répresseur et induit la transcription de fARFP et de la luciférase. Après quelques semaines de sélection, les clones résistants à l'hygromycine sont repiqués et amplifiés. La co-transfection s'effectue à un rapport pIV1093/pHyg de 20:1, et on estime que si les cellules ont intégré le gène de résistance à l'hygromycine, elles ont également intégré le plasmide pIV1093. Les clones inductibles pour l'expression de la luciférase sont supposés exprimer fARFP. L'induction luciférase étant facilement détectable, elle permet de s'affranchir en première intention de la détection de la protéine surproduite.

Au cours de nos expériences, nous avons obtenu des lignées inductibles à la luciférase : les lignées E3, E4 et E5 sont régulièrement inductibles alors que E2 ne l'est pas (**Fig. 57**). Par contre, la détection de la protéine fARFP n'a jamais été obtenue. L'induction à la doxycycline conduit à une mortalité cellulaire très importante, et cette inductibilité est perdue avec le temps. La lignée contrôle établie par transfection du vecteur pBI-L vide dans les cellules HEK293 Tet-on ne présente aucun problème de croissance après induction à la tétracycline, indiquant que c'est bien l'expression de fARFP qui conduit à la mort cellulaire.

Les observations obtenues avec les deux types de lignées stables, constitutives ou inductibles, indiquent que fARFP peut être toxique dans la cellule lorsqu'elle est exprimée de manière continue ou forte. En effet, l'expression ponctuelle de la protéine aboutit très rapidement à la mort cellulaire des lignées inductibles, et dans les lignées exprimant fARFP de façon constitutive les seules cellules qui survivent sont celles qui ont réussi à bloquer son expression. Cette caractéristique est très intéressante dans la recherche de la fonction de la protéine fARFP. Cependant, lorsque nous avons testé l'expression de protéines du cycle cellulaire dont les anticorps étaient disponibles au laboratoire (anti-p21, p27, cdc34, cdk2, c-myc, cycline A, BAX, cycline D1, BCL x) dans les extraits protéiques des lignées exprimant fARFP de manière constitutive, nous n'avons pas observé de modulation de ces protéines par

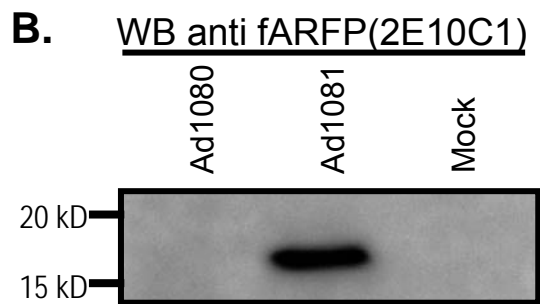
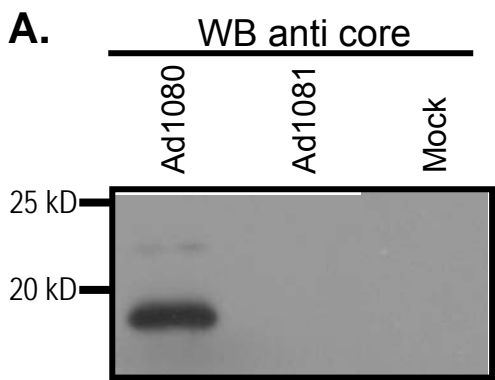


Figure 58. Caractérisation des adénovirus codant core (A, Ad1080) et fARFP (B, Ad1081) par western blot utilisant un anticorps anti-core ou anti-fARFP (Biomérieux, Lyon).

western blot. Lors de ces expériences, nous n'avons pas observé l'effet de fARFP sur p21 qui avait été décrit par d'autres auteurs (Basu *et al.* 2004).

III.4 Construction d'adénovirus recombinants

Dans le système de fusion ARFP-luciférase, nous nous sommes heurtés aux faibles niveaux d'expression d'ARFP dans la cellule. D'autre part, les lignées stables construites ne permettaient pas l'expression de fARFP de manière satisfaisante. Pour contourner ce problème et trouver un moyen d'exprimer cette protéine à des taux élevés dans toutes les cellules d'une culture, nous avons décidé de construire des adénovirus recombinants. Les adénovirus recombinants permettent d'exprimer les protéines d'intérêt sur des temps courts dans différentes cellules hôtes, même des cellules primaires, en s'affranchissant de la contrainte de la transfection. Les premiers adénovirus produits, Ad1080 et Ad1081, codent respectivement les protéines Core et fARFP. Ad1080 a été caractérisé en utilisant un anticorps monoclonal anti-core, et code les deux formes de core respectivement de 19 et de 21 kD (**Fig. 58A**). Un anticorps monoclonal anti-ARFP (Biomérieux, Lyon) révèle une bande à 17 kD dans les lysats de cellules Huh-7 infectées avec l'Ad1081 exprimant fARFP (**Fig. 58B**). Ces outils peuvent donc être utilisés pour étudier core et fARFP.

Cependant, comme nous avons montré que la principale forme traduite à partir de la phase +1 est ii_{86/88}ARFP, ces outils n'étaient plus complètement adaptés à l'étude de cette protéine. Les anticorps monoclonaux anti-ARFP dont nous disposons ne reconnaissant pas la forme la plus courte d'ARFP, nous avons construit des vecteurs adénoviraux contenant les séquences de core ou d'ii_{86/88}ARFP en fusion avec l'épitope HA. Un anticorps dirigé contre HA est alors utilisé pour caractériser les adénovirus produits à partir de ces vecteurs. Ad1084, qui code une partie de core (aa 1 à aa 161) en fusion avec HA, exprime fortement la protéine. Par contre, la détection d'ii_{86/88}ARFP-HA, codée par l'Ad1086 s'est avérée impossible. ii_{86/88}ARFP est une protéine de très faible poids moléculaire (environ 8 kD), ce qui complique sa détection par western blot. En effet, les protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kD sont difficilement détectées par les méthodes classiques. Différentes techniques alternatives comme l'utilisation de gels Tris-tricine plus ou moins concentrés en acrylamide, de divers tampons de migration, de conditions variées de transfert (membranes de transfert de plus faible porosité, temps de transfert raccourcis,...) n'ont pas permis de détecter ii_{86/88}ARFP-HA,

même en présence de l'inhibiteur de protéasome MG-132. Cet adénovirus ne semble pas produire de protéine ii_{86/88}ARFP-HA en quantité satisfaisante et sera reconstruit.

Quand la caractérisation des adénovirus en fusion à l'épitope HA sera achevée, notre but sera d'infecter des lignées cellulaires d'origine hépatocytaire et d'étudier l'expression différentielle de gènes cellulaires en réponse à core, à ii_{86/88}ARFP et à un adénovirus témoin (Ad-GFP). Cette étude sera réalisée par criblage d'expression de cytokines (cytokine array). Ce criblage permet de déterminer quels cytokines, chemokines et facteurs de croissance sont synthétisés en réponse à l'expression d'une protéine à partir de surnageants de culture ou de lysats cellulaires. Les supports utilisés comportent des représentants des familles de protéines impliquées dans des grandes voies de signalisation (inflammation, croissance cellulaire,...) et permettent de tester jusqu'à 120 molécules en une expérience. Ainsi, nous pourrions avoir un aperçu de l'effet de l'expression d'ii_{86/88}ARFP sur les voies de régulation de la cellule. Cette méthode nous donnera, nous l'espérons, des pistes pour la suite de l'étude du rôle d'ARFP.

III.5 Construction d'un clone JFH-1 muté dans les sites d'initiation d'ARFP

Jusqu'à l'été 2005, aucun système de propagation efficace du VHC n'était disponible, freinant ainsi considérablement la compréhension du cycle viral. Avec la mise en place du système JFH-1 permettant la production de virions VHC infectieux en culture cellulaire, nous disposons d'un moyen d'étudier le rôle de la protéine ii_{86/88}ARFP dans le cycle viral et/ou sur la cellule infectée. Le clone JFH-1 appartient au génotype 2a, qui présente de nombreuses différences avec le clone VHC-H77 de génotype 1a avec lequel nous avons réalisé notre étude. L'analyse de la séquence de JFH-1 montre cependant une séquence chevauchant la séquence de core en phase +1 qui comporte 3 AUG au niveau des codons 31, 87 et 89. Deux protéines ii₃₁ARFP et ii_{87/89}ARFP peuvent théoriquement être synthétisées dans le génotype 2a. La conservation de ces codons entre le génotype 1a et 2a est un argument supplémentaire en faveur des modes d'initiation de la traduction que nous avons décrits. Comme dans le génotype 1a, l'existence de 2 AUG en positions 87 et 89, indique que la protéine la plus courte pourrait être traduite à partir de 2 positions proches, ce qui renforce l'hypothèse de son importance dans le cycle viral et/ou dans la pathogénèse.

A partir du clone JFH-1, le seul paramètre que nous pouvons tester est l'effet de l'absence de la protéine ARFP. Pour cela, nous avons réalisé une mutagénèse dirigée sur les 3

sites d'initiation potentiels en phase +1 en insérant un codon stop à la place des AUG 31, 87 et 89. Par précaution, un autre codon stop est inséré en position 92. Ainsi, la traduction d'ARFP ne sera plus possible. Le génome obtenu est nommé JFH-1 Δ ARFP. Une fois que le modèle VHCcc sera mis en place au laboratoire, ce clone sera testé dans le contexte viral. Le génome viral muté codé par pIV1337 sera transcrit *in vitro* et électroporé dans la lignée cellulaire Huh-7.5. Dans un premier temps, nous comparerons les taux de réplication virale de JFH-1 Δ ARFP et du génome sauvage. Puis, les surnageants de culture seront utilisés pour infecter des cellules Huh-7.5 naïves. Cette étape nous permettra d'évaluer le rôle potentiel d'ARFP dans l'infectivité du VHC. Finalement, les effets des virus JFH-1 et JFH-1 Δ ARFP sur la biologie de la cellule seront étudiés par analyse de l'expression différentielle des ARNs cellulaires ou des protéines cellulaires provenant de cellules infectées par ces deux virus.

De façon complémentaire, les gènes des interactants d'ARFP isolés par le criblage double-hybride de la levure pourront être éteints en utilisant des siARN dans les cultures infectées par le virus JFH-1 sauvage.

Ces deux approches nous permettront d'apporter des réponses concernant le rôle d'ARFP dans les cellules au niveau du cycle viral d'une part et de l'homéostasie cellulaire d'autre part.

IV. Conclusion

Nous avons commencé l'étude du rôle de la protéine ARFP en déterminant la localisation subcellulaire des formes fARFP et ii_{86/88}ARFP. Cette étude a ensuite été poursuivie selon 3 axes principaux.

Tout d'abord, le criblage d'interactants d'ARFP a permis l'identification de 6 candidats qui interagissent à la fois avec fARFP et ii_{86/88}ARFP. La caractérisation de ces interactions *in vitro* et en lignée cellulaire est en cours. Nous avons également déterminé que fARFP n'interagit pas avec elle-même, ni avec core ou une protéine non structurale du VHC.

Différents outils ont été élaborés pour élucider la fonction d'ARFP. Deux types de lignées cellulaires ont été construits, exprimant fARFP de façon constitutive ou inductible. Dans les deux cas, l'expression de la protéine n'est pas possible à long terme : si elle est forte les cellules meurent au bout de quelques jours d'induction, et si elle est constitutive elle est perdue au fil des repiquages. Ces deux observations indiquent que fARFP est une protéine toxique à long terme pour la cellule. Ceci conforte le fait de son instabilité et d'un effet peut être très ponctuel dans le cycle viral. Nous n'avons cependant pas réussi à montrer l'implication de cette protéine dans la modulation des facteurs du cycle cellulaire que nous avons testés, qui pourraient expliquer l'entrée en apoptose des cellules de la lignée. Du fait de cette toxicité, les lignées cellulaires sont instables et ne sont pas de bons modèles d'étude du rôle de cette protéine.

D'autre part, des adénovirus recombinants codant respectivement core, fARFP et ii_{86/88}ARFP ont été produits, mais seuls les deux premiers ont pu être caractérisés. ii_{86/88}ARFP est une protéine de petit poids moléculaire ce qui rend sa détection délicate. Toutefois, dès que cet adénovirus sera caractérisé, il nous permettra de transduire avec une grande efficacité les cellules hépatocytaires et même des hépatocytes primaires qui sont la cible naturelle du virus. Nous détecterons le profil d'expression en cytokines, chemokines et facteurs de croissance par l'utilisation de cytokine array, ce qui nous guidera dans les voies de signalisation perturbées par cette protéine.

Finalement, une forme mutée du clone JFH-1 délétée de tous les sites d'initiation de la traduction d'ARFP a été construite. A l'état sauvage, ce clone est capable de produire des

particules VHC en culture cellulaire. Dans un premier temps, l'absence d'effet d'ARFP sur les étapes du cycle viral sera vérifiée, puis les profils d'expression des ARNs et/ou des protéines des cellules infectées par les virions sauvages ou mutés seront comparés par micro array et/ou cytokine array. Une autre approche du rôle de la protéine dans le cycle viral sera de réprimer l'expression des candidats interagants issus du double-hybride par ARN interférence dans les cellules infectées par le clone JFH-1.

L'ensemble de ces résultats montre la difficulté que nous avons rencontrée à chaque étape de l'étude de cette protéine, qui est selon les expériences mises en œuvre : trop faiblement exprimée, trop instable, trop toxique et finalement de trop petit poids moléculaire pour être détectée. Les derniers outils construits et l'obtention de clones infectieux du VHC devraient toutefois permettre de progresser dans la compréhension du rôle d'ARFP dans la biologie du VHC.

F. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le génome du virus de l'hépatite C est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Il est composé d'un cadre ouvert de lecture qui code une polyprotéine de 3010 aminoacides, flanqué en 5' et en 3' de deux régions non traduites (NTR) très conservées. La traduction du génome est dirigée par la partie 5'NTR qui se structure en un site d'entrée interne du ribosome (IRES). Par interaction avec la sous-unité ribosomale 40S, l'IRES permet le positionnement du ribosome à proximité du codon initiateur de la polyprotéine. Cette polyprotéine est ensuite clivée pour donner les protéines structurales core, E1, E2, p7 et les protéines non structurales de NS2 à NS5B.

Mes travaux de thèse ont été consacrés à **l'étude de l'expression de la protéine ARFP du VHC dans la cellule d'origine hépatique**. La découverte de cette protéine supplémentaire codée par le génome viral a eu lieu en plusieurs étapes successives. En 2001, la présence d'un cadre de lecture chevauchant l'ORF de la polyprotéine dans la phase +1 a été démontrée pour la première fois (Walewski *et al.* 2001). Ce cadre de lecture ouvert est appelé ARF (alternate reading frame) et la protéine résultant de sa traduction ARFP (ARF protein). La séquence ARF ne contient pas de codon AUG dans sa partie N-terminale. Par la suite, différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la traduction d'ARFP dans le génotype 1a : un décalage de cadre de lecture +1 à proximité du codon 11 de la polyprotéine (Xu *et al.* 2001), deux mécanismes d'initiation interne distincts au niveau des codons 26 et 86/88 de l'ARF (Vassilaki and Mavromara 2003; Baril and Brakier-Gingras 2005), aboutissant respectivement à la traduction des formes fARFP, ii₂₆ARFP et ii_{86/88}ARFP. Dans le génotype 1b, un décalage +1 au niveau du codon 42 puis un rephasage -1 au codon 144 a de plus été décrit (Boulant *et al.* 2003).

Nous avons décidé de nous intéresser à l'expression de la protéine ARFP en suivant deux axes principaux. Le premier axe, présenté dans le chapitre D de ce manuscrit, est **l'étude des mécanismes de traduction** permettant la synthèse d'ARFP dans la cellule. Le deuxième axe a été consacré à **l'étude de la fonction de la protéine ARFP**, et plus exactement à la recherche des conséquences de son expression dans la cellule et de son rôle dans le cycle viral. Les résultats obtenus ont été exposés dans le chapitre E.

Au vu du manque de cohésion des données bibliographiques disponibles sur la traduction d'ARFP et du nombre de sites d'initiation différents proposés, nous avons décidé de replacer la séquence ARF dans le contexte hépatique, cible du VHC, afin de déterminer **quelle(s) forme(s) d'ARFP est (sont) effectivement traduite(s) dans la cellule**. Pour répondre à cette question, nous avons construit une série de plasmides codant différentes parties de la séquence codante d'ARFP en fusion au gène rapporteur luciférase. Chaque séquence choisie contient un, deux, ou tous les sites d'initiation proposés de la protéine. Après transfection de ces plasmides dans une lignée cellulaire d'origine hépatique, la mesure de l'activité luciférase rend compte de l'efficacité de la traduction du (des) site(s) d'initiation considéré(s). Ces mesures comparées entre elles nous ont permis de déterminer la part de chaque site d'initiation de la traduction d'ARFP dans la synthèse des différentes formes de la protéine. Ces formes ont ensuite été visualisées par western blot. Nous avons ainsi pu montrer que seules deux formes d'ARFP sont traduites dans notre système : une forme majoritaire, ii_{86/88}ARFP, et une forme minoritaire ii₂₆ARFP. Par contre, la forme fARFP issue du décalage de cadre de lecture +1 proposé par Xu *et al*, n'a jamais été décelée, indiquant que dans notre système il n'y a pas d'événement de décalage de cadre de lecture détectable.

Nous avons ensuite cherché les **déterminants viraux impliqués dans la traduction** de cette protéine. Nous avons recréé un système aussi proche que possible du contexte VHC en insérant la structure située en 3' du génome (3'NTR) dans les plasmides ARF-luc et en exprimant les protéines structurales ou non structurales. La traduction d'ARFP n'est modifiée ni par l'IRES, ni par le 3'NTR, ni par l'addition d'aucune des protéines virales testées. Par contre, en inhibant la traduction de core dans les plasmides ARF-luc, nous avons pu démontrer un effet inhibiteur de la protéine core sur la traduction d'ARFP. A partir de cette observation, un mécanisme de régulation entre ces deux protéines peut être proposé, dans lequel le taux de synthèse d'ARFP est fonction de la disponibilité de la protéine core.

La traduction a également été testée dans des **lignées cellulaires d'origines différentes** et nous avons pu montrer que cette protéine est synthétisée sans spécificité d'hôte. Des résultats préliminaires indiquent qu'il en est de même dans les hépatocytes primaires. Nous avons pu également mesurer la traduction d'ARFP *in vitro*, dans un contexte coiffe-indépendant.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie soutient l'existence de la protéine ARFP sous forme ii₂₆ARFP et ii_{86/88}ARFP, cette dernière étant la protéine majoritairement traduite à partir de la séquence ARF dans la cellule.

Après avoir vérifié qu'ARFP est effectivement traduite dans la cellule, nous avons cherché à comprendre **l'impact de cette protéine dans la cellule hépatocytaire et son rôle dans le cycle viral** selon plusieurs approches complémentaires.

Nous avons commencé par étudier la **localisation subcellulaire d'ARFP**, susceptible de nous renseigner sur la fonction de cette protéine. Cependant, l'absence de localisation précise de la forme ii_{86/88}ARFP ne nous permet pas de restreindre son action à un compartiment cellulaire donné.

Nous avons ensuite recherché les **interactants cellulaires de fARFP** par criblage en double-hybride d'une banque d'ADNc de foie humain et identifié 6 partenaires potentiels. Ces interactions ont également été validées avec la forme ii_{86/88}ARFP. Toujours dans la levure, nous avons montré que fARFP n'interagit ni avec elle-même, ni avec core ou une des protéines non structurales du VHC.

Différents outils ont été construits pour étudier la protéine dans la cellule : des lignées cellulaires stables exprimant fARFP de façon constitutive ou inductible, des adénovirus recombinants codant fARFP ou ii_{86/88}ARFP, et finalement un clone capable de produire des virions en culture cellulaire, muté dans les trois sites d'initiation de la traduction d'ARFP : JFH-1ΔARFP.

L'ensemble de ces résultats ne nous a pas permis d'identifier la fonction d'ARFP dans la cellule hépatocytaire. fARFP est une protéine très instable, qui s'avère toxique dans les cellules eucaryotes à long terme ou lorsqu'elle est exprimée en grande quantité, et ii_{86/88}ARFP est une très petite protéine, très difficile à détecter. Les deux formes de la protéine sont faiblement traduites ce qui complique considérablement leur étude.

Les travaux présentés ouvrent de vastes perspectives pour la poursuite de ce travail, à court, moyen et long terme.

Nous pourrions étudier **l'impact de la surproduction de la protéine dans la cellule** à court terme en utilisant l'adénovirus recombinant codant ii_{86/88}ARFP. Nous envisageons

d'utiliser un système qui permet de cibler la voie cellulaire dans laquelle une protéine de fonction inconnue est impliquée, en détectant l'expression d'une batterie de cytokines, chemokines et facteurs de croissance sécrétés en réponse à la présence de la protéine. Ce test permet d'identifier rapidement des familles de gènes régulés (inflammation, apoptose,...), et nous permettra d'affiner les axes de recherche que nous développerons pour la poursuite de cette étude. Ces données nous permettront également d'envisager le rôle d'ARFP plus globalement, dans la pathogénèse liée à l'infection par le VHC.

Enfin, nous rechercherons le **rôle d'ARFP à la fois dans la cellule et dans le cycle viral du VHC** en utilisant le système JFH-1 qui permet la production de virions infectieux en culture cellulaire. Ceci sera réalisé soit directement en étudiant les caractéristiques de l'infection (réplication, assemblage, infectivité) par le clone JFH-1 Δ ARFP, soit indirectement en réprimant l'expression des interactants potentiels d'ARFP issus du double-hybride dans les cellules infectées par le clone JFH-1 sauvage. Quelle que soit la méthode choisie, l'impact d'ARFP sur la cellule pourra être mesuré par son effet sur le cycle viral ou sur l'expression différentielle de gènes cellulaires en réponse à l'absence de la protéine ou de ses partenaires dans une expérience de « micro array ».

Pendant que nous réalisons ces travaux, une régulation de p21 par fARFP a été décrite (Basu *et al.* 2004). Cette régulation n'avait pas été observée dans notre laboratoire. D'autre part, un criblage par double hybride dans la levure utilisant probablement fARFP (la nature du clone n'est pas précisée par les auteurs) a conduit à l'identification de la prefoldin 2 comme partenaire d'ARFP (Tsao *et al.* 2006). L'interaction entre prefoldin 2 et fARFP montre une désorganisation du cytosquelette de la cellule. Comme l'intégrité du cytosquelette est nécessaire pour la réplication du VHC, une hypothèse proposée est que fARFP serait une protéine de régulation exprimée en réponse à une réplication trop active de la cellule. Elle conduirait *via* la modification du cytosquelette à une diminution de la réplication permettant la survie cellulaire et la persistance de l'infection. Nous proposons que ces résultats soient confirmés pour ii_{86/88}ARFP avant de conclure à un tel rôle pour ARFP. A moyen terme, nous envisageons d'utiliser les outils dont nous disposons pour confirmer les deux rôles proposés par ces études pour cette forme plus courte de la protéine ARFP.

En plus des données que nous avons présentées, des arguments forts sont en faveur de l'importance de l'étude de la protéine ARFP. Tout d'abord, les cadres de lectures

chevauchants sont conservés dans tous les génotypes et les sites d'initiation de la traduction de cette protéine sont présents dans des souches très variées. A moyen terme, la détection d'anticorps dirigés contre la forme ii_{86/88}ARFP dans les sérums de patients nous apporterait la preuve de son expression lors de l'infection naturelle.

Au laboratoire, nous travaillons avec des génomes consensus du VHC pour chaque génotype. Ces génomes sont souvent bien éloignés des isolats qui infectent les patients. A plus long terme, une étude systématique des sites d'initiation de cette protéine pourrait être envisagée dans la banque européenne du VHC, qui compile tous les isolats du virus actuellement connus. Les données obtenues pourraient alors être mises en rapport avec la sévérité de l'hépatite C développée par les patients infectés par ces isolats. En effet, si ARFP est effectivement reliée à la pathogénèse, ses sites d'initiation pourraient être très conservés dans les génotypes qui donnent les formes les plus sévères de la maladie.

ARFP est donc une protéine bien énigmatique, qui est traduite par un mécanisme inhabituel. Aucun autre exemple de cadre de lecture chevauchant n'est retrouvé chez les membres de la famille des *Flaviviridae*. Parmi les picornavirus, qui possèdent également un IRES dirigeant la traduction d'une polyprotéine, plusieurs exemples d'initiation de la traduction à des AUG alternatifs ont été décrits, un seul ayant lieu dans une phase de lecture différente. En effet, le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV) code une protéine appelée L* dans le cadre de lecture +1, chevauchant le cadre de lecture de sa polyprotéine. Cette protéine, tout comme ARFP, a longtemps été considérée comme un artéfact, mais finalement son rôle a été identifié dans la persistance et la pathogénèse de l'infection par le TMEV. Il est donc tout à fait envisageable qu'une protéine traduite en faible quantité par un mécanisme tout à fait particulier et régulée par la protéine core comme nous l'avons montré joue un rôle important dans l'infection virale. S'il est plus que probable qu'ARFP n'intervient pas dans les mécanismes essentiels du cycle viral du VHC comme la traduction ou la réplication, son rôle est tout à fait concevable dans des mécanismes subtils de modification de la biologie de la cellule infectée.

La régulation spécifique de la traduction d'ARFP par la protéine core est intéressante pour plusieurs raisons. Par double-hybride dans la levure, nous avons montré que core et ARFP n'interagissent pas directement. L'interaction de core avec sa propre séquence a été montrée et pourrait freiner physiquement la traduction d'ARFP, maintenant la synthèse de cette protéine à des taux constants mais faibles. Dans ce cas, dès que core serait impliquée

dans d'autres étapes du cycle cellulaire, l'éloignant physiquement du lieu de traduction comme par exemple lors de l'encapsidation, ARFP serait traduite ponctuellement à des niveaux plus importants. Cette soudaine augmentation de l'expression d'ARFP pourrait servir par exemple de signal à l'export des virions néosynthétisés, ou à l'apoptose des hépatocytes infectés.

G. ANNEXES

I. Réplication du virus de l'hépatite C : Systèmes d'étude, avantages et limites.

Isabelle Imbert, Maria Dimitrova, Marie Wolf et Catherine Schuster.

Virologie 2004, 8 :281-95

Revue.

II. Tableau récapitulatif des constructions plasmidiques réalisées

Plasmides construits pour :

- A.** L'étude de la localisation.
- B.** Les dosages luciférase.
- C.** La production d'adénovirus recombinants.
- D.** L'expression de protéines dans la levure.
- E.** La surexpression de protéines en fusion à la GST.
- F.** La construction des lignées stables.
- G.** L'étude dans le modèle VHCcc.

A.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1072	pCI-neo	pEGFP-N1		EGFP avec cassette de clonage en N-term
1073	1072	1065	1102-1104	Fusion ARFP forcée - EGFP
1096	pCI-neo	pEGFP-C1		EGFP avec cassette de clonage en C-term
1097	1096	p90/HCV FL long pU	1128-1129	Fusion EGFP - Core
1098	1096	1065	1105-1128	Fusion EGFP - ARFP forcée
1141	1072	p90/HCV FL long pU	1102-1051	Core fusion à EFGP
1142	1072	p90/HCV FL long pU	1000-1051	IRES+Core fusion à EGFP
1349	1096	p90/HCV FL long pU	1103-1273	Fusion EGFP + ii86/88ARFP
1351	pCINeo		1264-1265	tag HA
1352	1351	P90/HCV FL long pU	1263-1273	ii86/88ARFP + HA

B.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1066	pCI-neo	pBIL		Luciférase
1087	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1119	FS fusion -1 à luc
1088	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1120	SL fusion -1 à luc
1089	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1121	PN fusion -1 à luc
1090	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1122	PN fusion 0 à luc
1091	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1119	IRES+FS fusion -1 à luc
1092	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1120	IRES+SL fusion -1 à luc
1094	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1122	IRES+ARF fusion -1 à luc
1095	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1121	IRES+ARF fusion -1 à luc
1099	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1130	IRES+ARF fusion 0 à luc
1000	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1104	IRES+ARF fusion -1 à luc
1001	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1133	IRES+FS+TB+PN fusion +1 à luc
1002	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1131	FS fusion +1 à luc
1003	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1132	FS+TB fusion +1 à luc
1004	1066	p90/HCV FL long pU	1102-1133	FS+TB+PN fusion +1 à luc
1005	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1131	IRES+FS fusion +1 à luc
1106	1066	p90/HCV FL long pU	1000-1132	IRES+FS+TB fusion +1 à luc
1115	pCI-neo	pBIL	1141-1142	Luciférase délétée de l'ATG
1116	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1121	IRES+FS+TB+PN fusion -1 à luc
1117	1115	p90/HCV FL long pU	1000-?	IRES+FS+TB+PN fusion 0 à luc
1118	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1133	IRES+FS+TB+PN fusion +1 à luc
1119	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1119	IRES+FS fusion -1 à luc
1120	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1120	IRES+SL fusion -1 à luc
1121	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1132	IRES+SL fusion +1 à luc
1122	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1139	IRES+FS fusion 0 à luc
1123	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1140	IRES+SL fusion 0 à luc
1124	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1131	IRES+FS fusion +1 à luc
1143	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1130	IRES+ARF fusion 0 à luc
1144	1115	p90/HCV FL long pU	1000-?	IRES+ARF fusion +1 à luc

B.

1145	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1130	ARF fusion 0 à luc
1146	1115	p90/HCV FL long pU	1102-?	ARF fusion +1 à luc
1147	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1104	ARF fusion -1 à luc
1157	1115	p90/HCV FL long pU	1000-1104	IRES+ARF fusion -1 à luc
1158	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1119	FS fusion -1 à luc
1159	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1120	SL fusion -1 à luc
1160	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1121	PN fusion-1 à luc
1161	1115	p90/HCV FL long pU	1102-?	PN fusion 0 à luc
1162	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1131	FS fusion +1 à luc
1163	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1140	SL fusion +1 à luc
1164	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1133	PN fusion +1 à luc
1165	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1139	FS fusion 0 à luc
1166	1115	p90/HCV FL long pU	1102-1132	SL fusion 0 à luc
1201		1117	1214-1215	IRES+PN fusion 0 à luc +stop ARFP
1202		1118	1212-1213	IRES+PN fusion +1 à luc +stop Core
1203		1143	1214-1215	IRES+ARF fusion 0 à luc + stop ARFP
1204		1144	1212-1213	IRES+ARF fusion +1 à luc + stop Core
1205		1145	1214-1215	ARF fusion 0 à luc + stop ARFP
1206		1146	1212-1213	ARF fusion +1 à luc + stop Core
1207		1161	1214-1215	PN fusion 0 à luc + stop ARFP
1208		1164	1212-1213	PN fusion +1 à luc + stop Core
1238		1118	1214-1215	IRES+PN fusion +1 à luc + stop ARFP
1239		1164	1214-1215	PN fusion +1 à luc + stop ARFP
1240		1144	1214-1215	IRES+ARF fusion +1 à luc + stop ARFP
1241		1146	1214-1215	ARF fusion +1 à luc + stop ARFP
1242	1143	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion 0 à luc + 3'NTR
1243	1144	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion +1 à luc + 3'NTR
1244	1145	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion 0 à luc + 3'NTR
1245	1146	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion +1 à luc + 3'NTR
1246	1147	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion -1 à luc + 3'NTR
1247	1157	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion -1 à luc + 3'NTR
1248	1240	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + 3'NTR
1249	1241	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + 3'NTR
1262		1240	1244-1245	IRES+ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + stop Core
1263		1241	1244-1245	ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + stop Core
1264		1248	1244-1245	IRES+ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + stop Core + 3'NTR
1265		1249	1244-1245	ARF fusion +1 à luc + stop ARFP + stop Core + 3'NTR
1266	1066	p90/HCV FL long pU	1240-1241	Luciférase + 3'NTR
1267	1203	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion 0 à luc + stop ARFP + 3'NTR
1268	1204	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion 0 à luc + stop ARFP + 3'NTR
1269	1205	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion +1 à luc + stop Core + 3'NTR
1270	1206	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF en fusion +1 avec luc + stop Core + 3'NTR

B.

1271		1201	1244-1245	IRES+PN fusion 0 avec luc + stop Core + stop ARFP
1272		1203	1244-1245	IRES+ARF fusion 0 à luc + stop Core + stop ARFP
1273		1205	1244-1245	ARF fusion 0 à luc + stop Core + stop ARFP
1274		1207	1244-1245	PN fusion 0 à luc + stop Core + stop ARFP
1275		1238	1244-1245	IRES+PN fusion +1 à luc + stop Core + stop ARFP
1276		1239	1244-1245	PN fusion +1 à luc + stop Core + stop ARFP
1277	1272	p90/HCV FL long pU	1240-1241	IRES+ARF fusion 0 à luc + stop Core + stop ARFP + 3'NTR
1278	1273	p90/HCV FL long pU	1240-1241	ARF fusion 0 à luc + stop Core + stop ARFP + 3'NTR
1289		1117	1212-1213	IRES+PN fusion 0 à luc + stop Core
1290		1161	1212-1213	PN fusion 0 à luc + stop Core
1291		1143	1212-1213	IRES+ARF fusion 0 à luc + stop Core
1292		1145	1212-1213	ARF fusion 0 à luc + stop Core 161 Core delta Core

C.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1210	pTG13387	p90/HCV FL long pU	1128-1129	Core complète dans le vecteur de transfert
1211	pTG13387	1065	1102-1217	ARFP "forcée" complète dans le vecteur de transfert
1212		1210	1214-1215	Core complète + stop ARFP dans le vecteur de transfert
1213		1211	1212-1213	ARFP complète + stop Core dans le vecteur de transfert
1250	pTG6624	1210		Adénovirus Core
1251	pTG6624	1211		Adénovirus ARFP
1252	pTG6624	1212		Adénovirus Core + stop ARFP
1253	pTG6624	1213		Adénovirus ARFP + stop Core
1333	pTG13387	p90/HCV FL long pU	1102-1217	ARF complet dans vecteur de transfert
1334	pTG6624	1333		Adénovirus ARFP
1338	pTG13387		1264-1265	tag HA dans vecteur de transfert
1339	1338	p90/HCV FL long pU	1102-1263	ARF complet + HA dans vecteur de transfert
1340	pTG6624	1339		Adénovirus ARFP-HA
1341		1339	1212-1213	ARF complet + stop Core + HA dans vecteur transfert
1342	1338		1273-1263	ii86/88ARFP + HA dans vecteur de transfert
1343	pTG6624	1342		Adénovirus ii86/88ARFP + HA
1346	pTG6624	1341		Adénovirus ARFP + stop Core + HA
1353	1338	p90/HCV FL long pU	1102-1263	ARF complet en fusion+1 avec HA
1354	1338	1206	1102-1263	ARF complet + stop Core en fusion +1 avec HA
1355	1338	p90/HCV FL long pU	1263-1273	ii86/88ARFP + HA dans vecteur transfert
1356	1338	1241	1102-1263	ARF + stop ARFP en fusion +1 avec HA dans vecteur transfert
1357	1338	1265	1102-1263	ARFP "forcée" + HA dans vecteur transfert
1358	pTG6624	1353		Adénovirus ARFP en fusion +1 HA
1359	pTG6624	1354		Adénovirus ARF + stop Core en fusion +1 avec HA
1360	pTG6624	1355		Adénovirus ii86/88ARFP + HA
1361	pTG6624	1356		Adénovirus ARF + stop ARFP fusion +1 avec HA
1362	pTG6624	1357		Adénovirus ARFP "forcée" + HA

D.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1064	pGBK-T7	p90/HCV FL long pU	1100-1103 et 1101-1102	ARFP forcée
1065	pGAD-T7	p90/HCV FL long pU	1100-1103 et 1101-1102	ARFP forcée
1067	pGBK-T7	p90/HCV FL long pU	1102-1129	core
1279	pGAD-T7	p90/HCV FL long pU	1102-1129	core
1313	pGBK-T7	pIV1319		Clone 6-DH
1314	pGBK-T7	pIV1320		Clone 7-DH
1315	pGBK-T7	pIV1321		Clone 10-DH
1316	pGBK-T7	pIV1322		Clone 26-DH
1317	pGBK-T7	pIV1323		Clone 27-DH
1318	pGBK-T7	pIV1324		Clone 34-DH
1319	pACT2	issu double hybride		Clone 6-DHF
1320	pACT2	issu double hybride		Clone 7-DHF
1321	pACT2	issu double hybride		Clone 10-DHF
1322	pACT2	issu double hybride		Clone 26-DHF
1323	pACT2	issu double hybride		Clone 27-DHF
1324	pACT2	issu double hybride		Clone 34-DHF
1344	pGADT7		1103-1273	ii86/88ARFP
1345	pGBKT7		1103-1273	ii86/88ARFP

E.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1348	pGEX-4T-1	p90/HCV FL long pU	1103-1273	Fusion GST + ii86/88ARFP

F.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1093	pBI-L	pIV1067	1106-1107	fARFP-Flag
1108	pCI-neo	pIV1067	1106-1107	fARFP-Flag

G.

pIV	Vecteur	Matrice	oIV	Insert
1335	pCINeo	pJFH1		Fragment EcoRI - NotI du clone JFH1
1336	pCINeo	1335	1266-1268	ARF du clone JFH1 + stop ARFP + 2 ATG internes mutés
1337	JFH1			Clone JFH1 + stop ARFP + 2 ATG internes mutés
1347	pCINeo			Mutagenèse dirigée sur 1335 avec seulement la 1e mut

H. BIBLIOGRAPHIE

- Ackerman, Z., E. Ackerman and O. Paltiel (2000). "Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review." J Viral Hepat **7**(2): 93-103.
- Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight and Q. X. Zhang (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12766-71.
- Agnello, V. and F. G. De Rosa (2004). "Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues." J Hepatol **40**(2): 341-52.
- Ait-Goughoulte, M., C. Hourieux, R. Patient, S. Trassard, D. Brand and P. Roingard (2006). "Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly." J Gen Virol **87**(Pt 4): 855-60.
- Ali, N., G. J. Pruijn, D. J. Kenan, J. D. Keene and A. Siddiqui (2000). "Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation." J Biol Chem **275**(36): 27531-40.
- Ali, N. and A. Siddiqui (1995). "Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation." J Virol **69**(10): 6367-75.
- Alisi, A., S. Giambartolomei, F. Cupelli, P. Merlo, G. Fontemaggi, A. Spaziani and C. Balsano (2003). "Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms." Oncogene **22**(17): 2573-80.
- Alkalaeva, E. Z., A. V. Pisarev, L. Y. Frolova, L. L. Kisselev and T. V. Pestova (2006). "In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3." Cell **125**(6): 1125-36.
- Alter, H. J., P. V. Holland, A. G. Morrow, R. H. Purcell, S. M. Feinstone and Y. Moritsugu (1975). "Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis." Lancet **2**(7940): 838-41.
- Alter, M. J. (2002). "Prevention of spread of hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S93-8.
- Alter, M. J., P. J. Coleman, W. J. Alexander, E. Kramer, J. K. Miller, E. Mandel, S. C. Hadler and H. S. Margolis (1989). "Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis." Jama **262**(9): 1201-5.
- Alvarez-Munoz, M. T., M. A. Vences-Aviles, L. Damacio, G. Vazquez-Rosales, J. Torres, F. Gonzalez-Bravo and O. Munoz (2001). "Hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) in blood donors and family members seropositive for anti-HCV antibodies." Arch Med Res **32**(5): 442-5.
- Andre, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot and V. Lotteau (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." Semin Liver Dis **25**(1): 93-104.
- Anwar, A., N. Ali, R. Tanveer and A. Siddiqui (2000). "Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation." J Biol Chem **275**(44): 34231-5.
- Appel, N., T. Pietschmann and R. Bartenschlager (2005). "Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain." J Virol **79**(5): 3187-94.

- Astier-Gin, T., P. Bellecave, S. Litvak and M. Ventura (2005). "Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA." *Febs J* **272**(15): 3872-86.
- Aus dem Siepen, M., V. Lohmann, M. Wiese, S. Ross, M. Roggendorf and S. Viazov (2005). "Nonstructural protein 5A does not contribute to the resistance of hepatitis C virus replication to interferon alpha in cell culture." *Virology* **336**(2): 131-6.
- Azzari, C., M. Resti, M. Moriondo, R. Ferrari, P. Lionetti and A. Vierucci (2000). "Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection." *Blood* **96**(6): 2045-8.
- Baek, K. H., H. Y. Park, C. M. Kang, S. J. Kim, S. J. Jeong, E. K. Hong, J. W. Park, Y. C. Sung, T. Suzuki, C. M. Kim and C. W. Lee (2006). "Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation." *J Mol Biol* **359**(1): 22-34.
- Bain, C., P. Parroche, J. P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin and G. Inchauspe (2004). "Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection." *J Virol* **78**(19): 10460-9.
- Banerjee, R. and A. Dasgupta (2001). "Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA." *J Virol* **75**(4): 1708-21.
- Baranov, P. V., R. F. Gesteland and J. F. Atkins (2004). "P-site tRNA is a crucial initiator of ribosomal frameshifting." *Rna* **10**(2): 221-30.
- Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura and C. Brechot (1997). "Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1200-5.
- Baril, M. and L. Brakier-Gingras (2005). "Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein." *Nucleic Acids Res* **33**(5): 1474-86.
- Bartenschlager, R., M. Frese and T. Pietschmann (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." *Adv Virus Res* **63**: 71-180.
- Barth, H., C. Schafer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H. E. Blum and T. F. Baumert (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." *J Biol Chem* **278**(42): 41003-12.
- Barth, H., E. K. Schnober, F. Zhang, R. J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. E. Blum and T. F. Baumert (2006). "Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction." *J Virol* **80**(21): 10579-90.
- Barth, H., A. Ulsenheimer, G. R. Pape, H. M. Diepolder, M. Hoffmann, C. Neumann-Haefelin, R. Thimme, P. Henneke, R. Klein, G. Paranhos-Baccala, E. Depla, T. J. Liang, H. E. Blum and T. F. Baumert (2005). "Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells." *Blood* **105**(9): 3605-14.

- Bartosch, B., J. Bukh, J. C. Meunier, C. Granier, R. E. Engle, W. C. Blackwelder, S. U. Emerson, F. L. Cosset and R. H. Purcell (2003a). "In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14199-204.
- Bartosch, B., J. Dubuisson and F. L. Cosset (2003b). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.
- Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J. M. Pawlotsky, D. Lavillette and F. L. Cosset (2005). "An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies." J Virol **79**(13): 8217-29.
- Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia and F. L. Cosset (2003c). "Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor." J Biol Chem **278**(43): 41624-30.
- Bassett, S. E., K. M. Brasky and R. E. Lanford (1998). "Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles." J Virol **72**(4): 2589-99.
- Basu, A., R. Steele, R. Ray and R. B. Ray (2004). "Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus." J Gen Virol **85**(Pt 8): 2299-306.
- Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong and T. J. Liang (1998). "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." J Virol **72**(5): 3827-36.
- Baumert, T. F., J. Vergalla, J. Satoi, M. Thomson, M. Lechmann, D. Herion, H. B. Greenberg, S. Ito and T. J. Liang (1999). "Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate." Gastroenterology **117**(6): 1397-407.
- Bayraktar, Y., M. Bayraktar, A. Gurakar, T. I. Hassanein and D. H. Van Thiel (1997). "A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases." Hepatogastroenterology **44**(14): 417-25.
- Beier, H. and M. Grimm (2001). "Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs." Nucleic Acids Res **29**(23): 4767-82.
- Belcourt, M. F. and P. J. Farabaugh (1990). "Ribosomal frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site." Cell **62**(2): 339-52.
- Belec, L., J. Legoff, A. Si-Mohamed, F. Bloch, M. Matta, F. X. Mbopi-Keou and C. Payan (2003). "Cell-associated, non-replicating strand(+) hepatitis C virus-RNA shedding in cervicovaginal secretions from chronically HCV-infected women." J Clin Virol **27**(3): 247-51.
- Belsham, G. J. (1992). "Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo." Embo J **11**(3): 1105-10.
- Berenguer, M. (2002). "Natural history of recurrent hepatitis C." Liver Transpl **8**(10 Suppl 1): S14-8.
- Bertaux, C. and T. Dragic (2006). "Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry." J Virol **80**(10): 4940-8.

- Bianco, E., T. Stroffolini, E. Spada, A. Szklo, F. Marzolini, P. Ragni, G. Gallo, E. Balocchini, A. Parlato, M. Sangalli, P. L. Lopalco and C. Zotti (2003). "Case fatality rate of acute viral hepatitis in Italy: 1995-2000. An update." Dig Liver Dis **35**(6): 404-8.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski and Y. Rouille (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." J Virol **80**(14): 6964-72.
- Blanchard, E., D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau and P. Roingard (2002). "Hepatitis C virus-like particle morphogenesis." J Virol **76**(8): 4073-9.
- Blight, K. J., A. A. Kolykhalov and C. M. Rice (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." Science **290**(5498): 1972-4.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter and S. Visnich (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." Jama **191**: 541-6.
- Bode, J. G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P. C. Heinrich and D. Haussinger (2003). "IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3." Faseb J **17**(3): 488-90.
- Boehring, D., R. Thermann, A. Ostareck-Lederer, J. D. Lewis and H. Stark (2005). "Structure of the hepatitis C Virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES." Structure (Camb) **13**(11): 1695-706.
- Boni, S., J. P. Laverne, S. Boulant and A. Cahour (2005). "Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA." J Biol Chem **280**(18): 17737-48.
- Bortolotti, F., M. Resti, R. Giacchino, C. Crivellaro, L. Zancan, C. Azzari, N. Gussetti, L. Tasso and S. Faggion (1998). "Changing epidemiologic pattern of chronic hepatitis C virus infection in Italian children." J Pediatr **133**(3): 378-81.
- Bost, A. G., D. Venable, L. Liu and B. A. Heinz (2003). "Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system." J Virol **77**(7): 4401-8.
- Boulant, S., M. Becchi, F. Penin and J. P. Laverne (2003). "Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b." J Biol Chem **278**(46): 45785-92.
- Boulant, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratinier, P. Targett-Adams, J. P. Laverne, F. Penin and J. McLauchlan (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." J Biol Chem **281**(31): 22236-47.
- Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin and J. P. Laverne (2005). "Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features." J Virol **79**(17): 11353-65.
- Bourlet, T., R. Levy, A. Maertens, J. C. Tardy, F. Grattard, H. Cordonier, J. L. Laurent, J. F. Guerin and B. Pozzetto (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**(9): 3252-5.
- Bradrick, S. S., R. W. Walters and M. Gromeier (2006). "The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase." Nucleic Acids Res **34**(4): 1293-303.

- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J. A. Hellings, H. E. Blum, F. Penin and D. Moradpour (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J Biol Chem* **277**(10): 8130-9.
- Brechot, C., F. Jaffredo, D. Lagorce, G. Gerken, K. Meyer zum Buschenfelde, A. Papakonstantinou, S. Hadziyannis, R. Romeo, M. Colombo, J. Rodes, J. Bruix, R. Williams and N. Naoumov (1998). "Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action." *J Hepatol* **29**(2): 173-83.
- Brierley, I., A. J. Jenner and S. C. Inglis (1992). "Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal." *J Mol Biol* **227**(2): 463-79.
- Bukh, J. and R. H. Purcell (2006). "A milestone for hepatitis C virus research: a virus generated in cell culture is fully viable in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3500-1.
- Busch, M. P., S. H. Kleinman and G. J. Nemo (2003). "Current and emerging infectious risks of blood transfusions." *Jama* **289**(8): 959-62.
- Carrera, G., J. L. Paternain, N. Carrere, J. Folch, M. Courtade-Saidi, C. Orfila, J. P. Vinel, L. Alric and B. Pipy (2003). "Hepatic metallothionein in patients with chronic hepatitis C: relationship with severity of liver disease and response to treatment." *Am J Gastroenterol* **98**(5): 1142-9.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin and J. Dubuisson (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." *J Virol* **76**(8): 3720-30.
- Cheng, G., J. Zhong and F. V. Chisari (2006). "Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8499-504.
- Cho, J., W. Baek, S. Yang, J. Chang, Y. C. Sung and M. Suh (2001). "HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation." *Biochim Biophys Acta* **1538**(1): 59-66.
- Choi, J., Z. Xu and J. H. Ou (2003). "Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting." *Mol Cell Biol* **23**(5): 1489-97.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-62.
- Cocquerel, L., J. C. Meunier, A. Op de Beeck, D. Bonte, C. Wychowski and J. Dubuisson (2001). "Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2." *J Gen Virol* **82**(Pt 7): 1629-35.
- Cocquerel, L., J. C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski and J. Dubuisson (1998). "A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2." *J Virol* **72**(3): 2183-91.
- Cocquerel, L., A. Op de Beeck, M. Lambot, J. Roussel, D. Delgrange, A. Pillez, C. Wychowski, F. Penin and J. Dubuisson (2002). "Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *Embo J* **21**(12): 2893-902.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin and J. Dubuisson (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." *J Virol* **74**(8): 3623-33.

- Codran, A., C. Royer, D. Jaeck, M. Bastien-Valle, T. F. Baumert, M. P. Kieny, C. A. Pereira and J. P. Martin (2006). "Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis." *J Gen Virol* **87**(Pt 9): 2583-93.
- Colin, C., D. Lanoir, S. Touzet, L. Meyaud-Kraemer, F. Bailly and C. Trepo (2001). "Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature." *J Viral Hepat* **8**(2): 87-95.
- Conte, D., M. Fraquelli, D. Prati, A. Colucci and E. Minola (2000). "Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women." *Hepatology* **31**(3): 751-5.
- Costa-Mattioli, M., Y. Svitkin and N. Sonenberg (2004). "La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6861-70.
- Craig, A. W., A. Haghighat, A. T. Yu and N. Sonenberg (1998). "Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation." *Nature* **392**(6675): 520-3.
- Dalgard, O., S. Jeansson, K. Skaug, N. Raknerud and H. Bell (2003). "Hepatitis C in the general adult population of Oslo: prevalence and clinical spectrum." *Scand J Gastroenterol* **38**(8): 864-70.
- Dane, D. S., C. H. Cameron and M. Briggs (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." *Lancet* **1**(7649): 695-8.
- De Francesco, R. and G. Migliaccio (2005). "Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C." *Nature* **436**(7053): 953-60.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice and J. Dubuisson (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." *J Virol* **71**(1): 697-704.
- Des Jarlais, D. C., T. Diaz, T. Perlis, D. Vlahov, C. Maslow, M. Latka, R. Rockwell, V. Edwards, S. R. Friedman, E. Monterroso, I. Williams and R. S. Garfein (2003). "Variability in the incidence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among young injecting drug users in New York City." *Am J Epidemiol* **157**(5): 467-71.
- Deuffic, S., L. Buffat, T. Poynard and A. J. Valleron (1999). "Modeling the hepatitis C virus epidemic in France." *Hepatology* **29**(5): 1596-601.
- Di Marco, S., M. Rizzi, C. Volpari, M. A. Walsh, F. Narjes, S. Colarusso, R. De Francesco, V. G. Matassa and M. Sollazzo (2000). "Inhibition of the hepatitis C virus NS3/4A protease. The crystal structures of two protease-inhibitor complexes." *J Biol Chem* **275**(10): 7152-7.
- Diaz, T., D. C. Des Jarlais, D. Vlahov, T. E. Perlis, V. Edwards, S. R. Friedman, R. Rockwell, D. Hoover, I. T. Williams and E. R. Monterroso (2001). "Factors associated with prevalent hepatitis C: differences among young adult injection drug users in lower and upper Manhattan, New York City." *Am J Public Health* **91**(1): 23-30.
- Dimitrova, M., I. Imbert, M. P. Kieny and C. Schuster (2003). "Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins." *J Virol* **77**(9): 5401-14.
- Domitrovich, A. M., K. W. Diebel, N. Ali, S. Sarker and A. Siddiqui (2005). "Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication." *Virology* **335**(1): 72-86.
- Dore, G. J., M. Law, M. MacDonald and J. M. Kaldor (2003). "Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia." *J Clin Virol* **26**(2): 171-84.

- Dreux, M., T. Pietschmann, C. Granier, C. Voisset, S. Ricard-Blum, P. E. Mangeot, Z. Keck, S. Fong, N. Vu-Dac, J. Dubuisson, R. Bartenschlager, D. Lavillette and F. L. Cosset (2006). "High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI." *J Biol Chem* **281**(27): 18285-95.
- Drummer, H. E., K. A. Wilson and P. Pountourios (2002). "Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81." *J Virol* **76**(21): 11143-7.
- Dubuisson, J. (2000). "Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins." *Curr Top Microbiol Immunol* **242**: 135-48.
- Dubuisson, J., S. Duvet, J. C. Meunier, A. Op De Beeck, R. Cacan, C. Wychowski and L. Cocquerel (2000). "Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein." *J Biol Chem* **275**(39): 30605-9.
- Dumas, E., C. Staedel, M. Colombat, S. Reigadas, S. Chabas, T. Astier-Gin, A. Cahour, S. Litvak and M. Ventura (2003). "A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR." *Nucleic Acids Res* **31**(4): 1275-81.
- Dumont, S., W. Cheng, V. Serebrov, R. K. Beran, I. Tinoco, Jr., A. M. Pyle and C. Bustamante (2006). "RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP." *Nature* **439**(7072): 105-8.
- Dumoulin, F. L., A. von dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J. R. Wands, T. Sauerbruch and U. Spengler (2003). "Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines." *Virology* **305**(2): 260-6.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour and K. Bienz (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-84.
- Einav, S., M. Elazar, T. Danieli and J. S. Glenn (2004). "A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication." *J Virol* **78**(20): 11288-95.
- Elghouzzi, M. H., F. Bouchardeau, J. Pillonel, E. Boiret, C. Tirtaine, V. Barlet, P. Monchamont, P. Maisonneuve, M. C. du Puy-Montbrun, D. Lyon-Caen and A. M. Courouce (2000). "Hepatitis C virus: routes of infection and genotypes in a cohort of anti-HCV-positive French blood donors." *Vox Sang* **79**(3): 138-44.
- Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner and C. Guguen-Guillouzo (2003). "The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis." *J Biol Chem* **278**(20): 18256-64.
- Evans, M. J., T. von Hahn, A. J. Syder, T. Hatzioannou, J. McKeating, P. D. Bieniasz and C. M. Rice (13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, 2006). Claudin-1 is essential for Hepatitis C virus cell entry, Cairns, Australia.
- Fanning, L. J. (2002). "The Irish paradigm on the natural progression of hepatitis C virus infection: an investigation in a homogeneous patient population infected with HCV 1b (review)." *Int J Mol Med* **9**(2): 179-84.
- Farabaugh, P. J. (1996). "Programmed translational frameshifting." *Annu Rev Genet* **30**: 507-28.
- Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter and R. H. Purcell (1996). "Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees

- by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15394-9.
- Farci, P., R. Strazzera, H. J. Alter, S. Farci, D. Degioannis, A. Coiana, G. Peddis, F. Usai, G. Serra, L. Chessa, G. Diaz, A. Balestrieri and R. H. Purcell (2002). "Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3081-6.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian and R. H. Purcell (1973). "Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness." Science **182**(116): 1026-8.
- Ferri, C. and M. T. Mascia (2006). "Cryoglobulinemic vasculitis." Curr Opin Rheumatol **18**(1): 54-63.
- Ferri, C., A. L. Zignego and S. A. Pileri (2002). "Cryoglobulins." J Clin Pathol **55**(1): 4-13.
- Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy and J. A. McKeating (1999). "Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81." J Virol **73**(8): 6235-44.
- Flint, M., T. von Hahn, J. Zhang, M. Farquhar, C. T. Jones, P. Balfe, C. M. Rice and J. A. McKeating (2006). "Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection." J Virol.
- Forns, X., R. Thimme, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell, F. V. Chisari and J. Bukh (2000). "Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13318-23.
- Franck, N., J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo and L. Erdtmann (2005). "Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome." J Virol **79**(5): 2700-8.
- Frank, C., M. K. Mohamed, G. T. Strickland, D. Lavanchy, R. R. Arthur, L. S. Magder, T. El Khoby, Y. Abdel-Wahab, E. S. Aly Ohn, W. Anwar and I. Sallam (2000). "The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt." Lancet **355**(9207): 887-91.
- Frick, D. N., R. S. Rypma, A. M. Lam and B. Gu (2004). "The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently." J Biol Chem **279**(2): 1269-80.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." J Virol **76**(11): 5326-38.
- Friebe, P., J. Boudet, J. P. Simorre and R. Bartenschlager (2005). "Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication." J Virol **79**(1): 380-92.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger and R. Bartenschlager (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." J Virol **75**(24): 12047-57.
- Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncalves, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman and J. Yu (2002). "Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection." N Engl J Med **347**(13): 975-82.

- Fuller, C. M., D. C. Ompad, S. Galea, Y. Wu, B. Koblin and D. Vlahov (2004). "Hepatitis C incidence-
-a comparison between injection and noninjection drug users in New York City." J Urban Health **81**(1): 20-4.
- Futterer, J., I. Potrykus, Y. Bao, L. Li, T. M. Burns, R. Hull and T. Hohn (1996). "Position-dependent
ATT initiation during plant pararetrovirus rice tungro bacilliform virus translation." J Virol
70(5): 2999-3010.
- Gale, M., Jr., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J.
Polyak, D. R. Gretch and M. G. Katze (1998). "Control of PKR protein kinase by hepatitis C
virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation." Mol Cell Biol
18(9): 5208-18.
- Gale, M., Jr. and E. M. Foy (2005). "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus." Nature
436(7053): 939-45.
- Gale, M., Jr., S. L. Tan and M. G. Katze (2000). "Translational control of viral gene expression in
eukaryotes." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 239-80.
- Garfein, R. S., D. Vlahov, N. Galai, M. C. Doherty and K. E. Nelson (1996). "Viral infections in short-
term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human
immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses." Am J Public Health **86**(5): 655-61.
- Gastaminza, P., S. B. Kapadia and F. V. Chisari (2006). "Differential Biophysical Properties of
Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles." J Virol.
- Geiss, G. K., V. S. Carter, Y. He, B. K. Kwieciszewski, T. Holzman, M. J. Korth, C. A. Lazaro, N.
Fausto, R. E. Bumgarner and M. G. Katze (2003). "Gene expression profiling of the cellular
transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the
hepatitis C virus nonstructural 5A protein." J Virol **77**(11): 6367-75.
- Gent, J. and I. Braakman (2004). "Low-density lipoprotein receptor structure and folding." Cell Mol
Life Sci **61**(19-20): 2461-70.
- Ghosn, J., M. Leruez-Ville and M. L. Chaix (2005). "[Sexual transmission of hepatitis C virus]." Presse
Med **34**(14): 1034-8.
- Gibb, D. M., R. L. Goodall, D. T. Dunn, M. Healy, P. Neave, M. Cafferkey and K. Butler (2000).
"Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum
transmission." Lancet **356**(9233): 904-7.
- Giedroc, D. P., C. A. Theimer and P. L. Nixon (2000). "Structure, stability and function of RNA
pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting." J Mol Biol **298**(2): 167-85.
- Goffard, A. and J. Dubuisson (2003). "Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins." Biochimie
85(3-4): 295-301.
- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz and D. Moradpour
(2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells
harboring subgenomic replicons." J Virol **77**(9): 5487-92.
- Gothel, S. F. and M. A. Marahiel (1999). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of
ubiquitous folding catalysts." Cell Mol Life Sci **55**(3): 423-36.

- Goutagny, N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe and C. Bain (2003). "Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection." J Infect Dis **187**(12): 1951-8.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris and D. J. Rowlands (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." FEBS Lett **535**(1-3): 34-8.
- Griffin, S. D., C. St Gelais, D. J. Rowlands and M. P. Harris (13th International Meeting on Hepatitis C and related Viruses, 2006). Examining the role of p7 during HCV replication in culture, Cairns, Australia.
- Grosset, C., C. Y. Chen, N. Xu, N. Sonenberg, H. Jacquemin-Sablon and A. B. Shyu (2000). "A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex." Cell **103**(1): 29-40.
- Hacker, U., K. Nybakken and N. Perrimon (2005). "Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 530-41.
- Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M. M. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi and Y. Matsuura (2005). "Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B." J Virol **79**(21): 13473-82.
- Hauri, A. M., G. L. Armstrong and Y. J. Hutin (2004). "The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings." Int J STD AIDS **15**(1): 7-16.
- He, Y., W. Yan, C. Coito, Y. Li, M. Gale, Jr. and M. G. Katze (2003). "The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins." J Gen Virol **84**(Pt 3): 535-43.
- Heinz, F. X., K. Stiasny and S. L. Allison (2004). "The entry machinery of flaviviruses." Arch Virol Suppl(18): 133-7.
- Hellard, M., C. Aitken, A. Mackintosh, A. Ridge and S. Bowden (2003). "Investigation of infection control practices and knowledge of hepatitis C among body-piercing practitioners." Am J Infect Control **31**(4): 215-20.
- Henderson, D. K. (2003). "Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the health care setting." Clin Microbiol Rev **16**(3): 546-68.
- Herzer, K., S. Weyer, P. H. Krammer, P. R. Galle and T. G. Hofmann (2005). "Hepatitis C virus core protein inhibits tumor suppressor protein promyelocytic leukemia function in human hepatoma cells." Cancer Res **65**(23): 10830-7.
- Hong, Z., C. E. Cameron, M. P. Walker, C. Castro, N. Yao, J. Y. Lau and W. Zhong (2001). "A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase." Virology **285**(1): 6-11.
- Hoofnagle, J. H., K. D. Mullen, D. B. Jones, V. Rustgi, A. Di Bisceglie, M. Peters, J. G. Waggoner, Y. Park and E. A. Jones (1986). "Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report." N Engl J Med **315**(25): 1575-8.
- Horner, H. C., K. Barbu, F. Bard, D. Hall, M. Janatpour, K. Manning, J. Morales, S. Porter, P. E. Setler, L. Tanner and et al. (1992). "Permeation of the blood-brain barrier for drug delivery to the brain." NIDA Res Monogr **120**: 218-29.

- Houghton, M. and S. Abrignani (2005). "Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus." Nature **436**(7053): 961-6.
- Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice and J. A. McKeating (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7271-6.
- Huang, J. T. and R. J. Schneider (1991). "Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein." Cell **65**(2): 271-80.
- Huang, L., J. Hwang, S. D. Sharma, M. R. Hargittai, Y. Chen, J. J. Arnold, K. D. Raney and C. E. Cameron (2005). "Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein." J Biol Chem **280**(43): 36417-28.
- Hubert, N., C. Sturchler, E. Westhof, P. Carbon and A. Krol (1998). "The 9/4 secondary structure of eukaryotic selenocysteine tRNA: more pieces of evidence." Rna **4**(9): 1029-33.
- Hutin, Y. J., A. M. Hauri and G. L. Armstrong (2003). "Use of injections in healthcare settings worldwide, 2000: literature review and regional estimates." Bmj **327**(7423): 1075.
- Hwang, L. Y., J. R. Kramer, C. Troisi, L. Bull, C. Z. Grimes, R. Lyster and M. J. Alter (2006). "Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population." Hepatology **44**(2): 341-51.
- Imbert, I., M. Dimitrova, F. Kien, M. P. Kieny and C. Schuster (2003). "Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1549-57.
- Indolfi, G., C. Azzari, M. Moriondo, F. Lippi, M. de Martino and M. Resti (2006). "Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission." J Med Virol **78**(7): 911-4.
- Ito, T. and M. M. Lai (1999). "An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence." Virology **254**(2): 288-96.
- Ito, T., S. M. Tahara and M. M. Lai (1998). "The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site." J Virol **72**(11): 8789-96.
- Jacks, T., H. D. Madhani, F. R. Masiarz and H. E. Varmus (1988). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." Cell **55**(3): 447-58.
- Jackson, R. (2000). Comparative view of initiation site selection mechanisms. . in J. W. H. N. Sonenberg, and M. B. Matthews Translational control of eukaryotic gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y: p. 127-184.
- Jackson, R. J. and A. Kaminski (1995). "Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond." Rna **1**(10): 985-1000.
- Jacobson, A. (1996). Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. in W. B. M. Hershey, M.B. Sonenberg, N. Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, N.Y. : 451-480.

- Jaeckel, E., M. Cornberg, H. Wedemeyer, T. Santantonio, J. Mayer, M. Zankel, G. Pastore, M. Dietrich, C. Trautwein and M. P. Manns (2001). "Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b." N Engl J Med **345**(20): 1452-7.
- Ji, H., C. S. Fraser, Y. Yu, J. Leary and J. A. Doudna (2004). "Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 16990-5.
- Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon and P. Sarnow (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science **309**(5740): 1577-81.
- Kalliampakou, K. I., M. Kalamvoki and P. Mavromara (2005). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation." J Gen Virol **86**(Pt 4): 1015-25.
- Kamal, S. M., A. Amin, M. Madwar, C. S. Graham, Q. He, A. Al Tawil, J. Rasenack, T. Nakano, B. Robertson, A. Ismail and M. J. Koziel (2004). "Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients." J Virol **78**(22): 12252-8.
- Kaminski, A., G. J. Belsham and R. J. Jackson (1994). "Translation of encephalomyocarditis virus RNA: parameters influencing the selection of the internal initiation site." Embo J **13**(7): 1673-81.
- Kamoshita, N., K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara and A. Nomoto (1997). "Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors." Virology **233**(1): 9-18.
- Kao, C. F., S. Y. Chen, J. Y. Chen and Y. H. Wu Lee (2004). "Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein." Oncogene **23**(14): 2472-83.
- Kapadia, S. B. and F. V. Chisari (2005). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2561-6.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." Annu Rev Biochem **73**: 657-704.
- Kato, J., N. Kato, H. Yoshida, S. K. Ono-Nita, Y. Shiratori and M. Omata (2002). "Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo." J Med Virol **66**(2): 187-99.
- Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami and T. Wakita (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology **125**(6): 1808-17.
- Kato, T., A. Furusaka, M. Miyamoto, T. Date, K. Yasui, J. Hiramoto, K. Nagayama, T. Tanaka and T. Wakita (2001). "Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient." J Med Virol **64**(3): 334-9.
- Kielian, M. (2006). "Class II virus membrane fusion proteins." Virology **344**(1): 38-47.
- Kim, J. H., K. Y. Paek, S. H. Ha, S. Cho, K. Choi, C. S. Kim, S. H. Ryu and S. K. Jang (2004). "A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon." Mol Cell Biol **24**(18): 7878-90.
- Kim, J. L., K. A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M. D. Dwyer, J. A. Landro, S. P. Chambers, W. Markland, C. A. Lepre, E. T. O'Malley, S. L. Harbeson, C. M. Rice, M. A. Murcko, P. R.

- Caron and J. A. Thomson (1996). "Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide." *Cell* **87**(2): 343-55.
- Kim, Y. K., S. H. Lee, C. S. Kim, S. K. Seol and S. K. Jang (2003). "Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation." *Rna* **9**(5): 599-606.
- Kisselev, L., M. Ehrenberg and L. Frolova (2003). "Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors?" *Embo J* **22**(2): 175-82.
- Ko, Y. C., M. S. Ho, T. A. Chiang, S. J. Chang and P. Y. Chang (1992). "Tattooing as a risk of hepatitis C virus infection." *J Med Virol* **38**(4): 288-91.
- Kolosov, P., L. Frolova, A. Seit-Nebi, V. Dubovaya, A. Kononenko, N. Oparina, J. Justesen, A. Efimov and L. Kisselev (2005). "Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1." *Nucleic Acids Res* **33**(19): 6418-25.
- Kolykhalov, A. A., E. V. Agapov, K. J. Blight, K. Mihalik, S. M. Feinstone and C. M. Rice (1997). "Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA." *Science* **277**(5325): 570-4.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone and C. M. Rice (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J Virol* **70**(6): 3363-71.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone and C. M. Rice (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." *J Virol* **74**(4): 2046-51.
- Komar, A. A. and M. Hatzoglou (2005). "Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence." *J Biol Chem* **280**(25): 23425-8.
- Komurian-Pradel, F., A. Rajoharison, J. L. Berland, V. Khouri, M. Perret, M. Van Roosmalen, S. Pol, F. Negro and G. Paranhos-Baccala (2004). "Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **40**(4): 900-9.
- Kontos, H., S. Naphthine and I. Brierley (2001). "Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8657-70.
- Koppel, E. A., K. P. van Gisbergen, T. B. Geijtenbeek and Y. van Kooyk (2005). "Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation." *Cell Microbiol* **7**(2): 157-65.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* **54**: 631-64.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann and R. Bartenschlager (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *J Virol* **80**(11): 5308-20.
- Kozak, M. (1986). "Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(9): 2850-4.
- Kozak, M. (1987). "Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes." *Mol Cell Biol* **7**(10): 3438-45.

- Kozak, M. (2001). "Constraints on reinitiation of translation in mammals." Nucleic Acids Res **29**(24): 5226-32.
- Kozak, M. (2002). "Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation." Gene **299**(1-2): 1-34.
- Kozak, M. (2005). "A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites." Nucleic Acids Res **33**(20): 6593-602.
- Krieger, M. (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI." Annu Rev Biochem **68**: 523-58.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker and J. H. Strauss (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108**(5): 717-25.
- Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S. M. Lemon and S. J. Watowich (2001). "Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein." J Virol **75**(5): 2119-29.
- Lagging, L. M., K. Meyer, R. J. Owens and R. Ray (1998). "Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus." J Virol **72**(5): 3539-46.
- Lancaster, A. M., E. Jan and P. Sarnow (2006). "Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site." Rna **12**(5): 894-902.
- Lee, S. H., Y. K. Kim, C. S. Kim, S. K. Seol, J. Kim, S. Cho, Y. L. Song, R. Bartenschlager and S. K. Jang (2005). "E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis." J Immunol **175**(12): 8226-35.
- Lesburg, C. A., M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino and P. C. Weber (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6**(10): 937-43.
- Leverero, M. (2006). "Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C." Oncogene **25**(27): 3834-47.
- Li, D., S. T. Takyar, W. B. Lott and E. J. Gowans (2003). "Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells." J Gen Virol **84**(Pt 4): 815-25.
- Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, Jr. and S. M. Lemon (2005a). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2992-7.
- Li, X. D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda and Z. J. Chen (2005b). "Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17717-22.
- Licznar, P., N. Mejlhede, M. F. Prere, N. Wills, R. F. Gesteland, J. F. Atkins and O. Fayet (2003). "Programmed translational -1 frameshifting on hexanucleotide motifs and the wobble properties of tRNAs." Embo J **22**(18): 4770-8.

- Lin, C. C., S. J. Hwang, S. T. Chiou, C. L. Kuan, L. W. Chen, T. C. Lee, M. B. Lee, H. H. Lee, P. S. Hsu and S. T. Tsai (2003). "The prevalence and risk factors analysis of serum antibody to hepatitis C virus in the elders in northeast Taiwan." J Chin Med Assoc **66**(2): 103-8.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating and C. M. Rice (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science **309**(5734): 623-6.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." Nature **436**(7053): 933-8.
- Lindquist, S. and R. Petersen (1990). "Selective translation and degradation of heat-shock messenger RNAs in *Drosophila*." Enzyme **44**(1-4): 147-66.
- Liou, T. C., T. T. Chang, K. C. Young, X. Z. Lin, C. Y. Lin and H. L. Wu (1992). "Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites." J Med Virol **37**(3): 197-202.
- Liu, Q., R. A. Bhat, A. M. Prince and P. Zhang (1999). "The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 572-7.
- Logvinoff, C., M. E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S. M. Feinstone, H. Alter, C. M. Rice and J. A. McKeating (2004). "Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10149-54.
- Lohmann, V., S. Hoffmann, U. Herian, F. Penin and R. Bartenschlager (2003). "Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture." J Virol **77**(5): 3007-19.
- Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska and R. Bartenschlager (2001). "Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation." J Virol **75**(3): 1437-49.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann and R. Bartenschlager (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-3.
- Lorenz, I. C., J. Marcotrigiano, T. G. Dentzer and C. M. Rice (2006). "Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease." Nature **442**(7104): 831-5.
- Lozach, P. Y., A. Amara, B. Bartosch, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, F. L. Cosset and R. Altmeyer (2004). "C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles." J Biol Chem **279**(31): 32035-45.
- Lozach, P. Y., H. Lortat-Jacob, A. de Lacroix de Lavalette, I. Staropoli, S. Foug, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and R. Altmeyer (2003). "DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2." J Biol Chem **278**(22): 20358-66.
- Luby, S. P., K. Qamruddin, A. A. Shah, A. Omair, O. Pahsa, A. J. Khan, J. B. McCormick, F. Hoodbhoy and S. Fisher-Hoch (1997). "The relationship between therapeutic injections and high prevalence of hepatitis C infection in Hafizabad, Pakistan." Epidemiol Infect **119**(3): 349-56.
- Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne and M. A. Persson (2003). "Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B." J Virol **77**(9): 5428-38.

- Lunel, F., M. Mariotti, P. Cresta, I. De la Croix, J. M. Hureau and J. J. Lefrere (1995). "Comparative study of conventional and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in-house PCR." J Virol Methods **54**(2-3): 159-71.
- MacCallum, F. (1947). "Homologous serum jaundice lancet " Lancet **2**: 691-692.
- Majeau, N., V. Gagne, M. Bolduc and D. Leclerc (2005). "Signal peptide peptidase promotes the formation of hepatitis C virus non-enveloped particles and is captured on the viral membrane during assembly." J Gen Virol **86**(Pt 11): 3055-64.
- Maraia, R. J. (2001). "La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts." J Cell Biol **153**(4): F13-8.
- Mariano, A., A. Mele, M. E. Tosti, A. Parlato, G. Gallo, P. Ragni, C. Zotti, P. Lopalco, M. G. Pompa, G. Graziani and T. Stroffolini (2004). "Role of beauty treatment in the spread of parenterally transmitted hepatitis viruses in Italy." J Med Virol **74**(2): 216-20.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." Cell **124**(4): 729-40.
- Martin, S. and R. G. Parton (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." Semin Cell Dev Biol **16**(2): 163-74.
- Matsufuji, S., T. Matsufuji, Y. Miyazaki, Y. Murakami, J. F. Atkins, R. F. Gesteland and S. Hayashi (1995). "Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme." Cell **80**(1): 51-60.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope and B. Martoglio (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." Embo J **21**(15): 3980-8.
- McMahon, J. M., M. Simm, D. Milano and M. Clatts (2004). "Detection of hepatitis C virus in the nasal secretions of an intranasal drug-user." Ann Clin Microbiol Antimicrob **3**: 6.
- McMahon, J. M. and S. Tortu (2003). "A potential hidden source of hepatitis C infection among noninjecting drug users." J Psychoactive Drugs **35**(4): 455-60.
- Mehta, S. H., A. Cox, D. R. Hoover, X. H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S. A. Strathdee, D. Vlahov and D. L. Thomas (2002). "Protection against persistence of hepatitis C." Lancet **359**(9316): 1478-83.
- Mele, A., M. A. Stazi, R. Corona, L. Ferrigno, L. Saggiocca, F. Palumbo, P. Falasca, C. Galanti, A. Moiraghi, F. Rosmini and et al. (1990). "Decline of incidence of A, B and non-A, non-B hepatitis in Italy. Results of four years surveillance (1985-88). SEIEVA collaborating group." Ital J Gastroenterol **22**(5): 274-80.
- Mele, A., M. E. Tosti, A. Marzolini, A. Moiraghi, P. Ragni, G. Gallo, E. Balocchini, F. Santonastasi and T. Stroffolini (2000). "Prevention of hepatitis C in Italy: lessons from surveillance of type-specific acute viral hepatitis. SEIEVA collaborating Group." J Viral Hepat **7**(1): 30-5.
- Meola, A., A. Sbardellati, B. Bruni Ercole, M. Cerretani, M. Pezzanera, A. Ceccacci, A. Vitelli, S. Levy, A. Nicosia, C. Traboni, J. McKeating and E. Scarselli (2000). "Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection." J Virol **74**(13): 5933-8.
- Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, K. P. Fischer, T. A. Churchill, J. R. Lakey, D. L. Tyrrell and N. M. Kneteman (2001). "Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers." Nat Med **7**(8): 927-33.

- Meyers, G. (2003). "Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism." *J Biol Chem* **278**(36): 34051-60.
- Miller, C. L., C. Johnston, P. M. Spittal, K. Li, N. Laliberte, J. S. Montaner and M. T. Schechter (2002). "Opportunities for prevention: hepatitis C prevalence and incidence in a cohort of young injection drug users." *Hepatology* **36**(3): 737-42.
- Mizushima, H., M. Hijikata, Y. Tanji, K. Kimura and K. Shimotohno (1994). "Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2." *J Virol* **68**(4): 2731-4.
- Mizutani, A., M. Fukuda, K. Ibata, Y. Shiraishi and K. Mikoshiba (2000). "SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms." *J Biol Chem* **275**(13): 9823-31.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin and V. Lohmann (2004a). "Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **78**(23): 13278-84.
- Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach and C. M. Rice (2004b). "Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes." *J Virol* **78**(14): 7400-9.
- Murray, J. M., M. G. Law, Z. Gao and J. M. Kaldor (2003). "The impact of behavioural changes on the prevalence of human immunodeficiency virus and hepatitis C among injecting drug users." *Int J Epidemiol* **32**(5): 708-14.
- Nakai, K., T. Okamoto, T. Kimura-Someya, K. Ishii, C. K. Lim, H. Tani, E. Matsuo, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Miyamura, J. H. Nunberg, K. Moriishi and Y. Matsuura (2006). "Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein." *J Virol*.
- Namy, O., S. J. Moran, D. I. Stuart, R. J. Gilbert and I. Brierley (2006). "A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting." *Nature* **441**(7090): 244-7.
- Navas, M. C., A. Fuchs, E. Schvoerer, A. Bohbot, A. M. Aubertin and F. Stoll-Keller (2002). "Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection." *J Med Virol* **67**(2): 152-61.
- Neumann, A. U., N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden and A. S. Perelson (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." *Science* **282**(5386): 103-7.
- Nomura-Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, S. Kitazawa, S. Ishido, K. Sada and H. Hotta (2006). "Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis." *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 1935-45.
- Ohto, H., S. Terazawa, N. Sasaki, N. Sasaki, K. Hino, C. Ishiwata, M. Kako, N. Ujiie, C. Endo, A. Matsui and et al. (1994). "Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group." *N Engl J Med* **330**(11): 744-50.
- Okamoto, K., K. Moriishi, T. Miyamura and Y. Matsuura (2004). "Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein." *J Virol* **78**(12): 6370-80.

- Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi and Y. Matsuura (2006). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90." Embo J.
- Op De Beeck, A., L. Cocquerel and J. Dubuisson (2001). "Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins." J Gen Virol **82**(Pt 11): 2589-95.
- Ortiz-Movilla, N., P. Lazaro, E. Rodriguez-Inigo, J. Bartolome, I. Longo, M. Lecona, M. Pardo and V. Carreno (2002). "Hepatitis C virus replicates in sweat glands and is released into sweat in patients with chronic hepatitis C." J Med Virol **68**(4): 529-36.
- Otto, G. A. and J. D. Puglisi (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation." Cell **119**(3): 369-80.
- Pande, S., A. Vimaladithan, H. Zhao and P. J. Farabaugh (1995). "Pulling the ribosome out of frame by +1 at a programmed frameshift site by cognate binding of aminoacyl-tRNA." Mol Cell Biol **15**(1): 298-304.
- Pang, P. S., E. Jankowsky, P. J. Planet and A. M. Pyle (2002). "The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding." Embo J **21**(5): 1168-76.
- Pause, A., N. Methot, Y. Svitkin, W. C. Merrick and N. Sonenberg (1994). "Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation." Embo J **13**(5): 1205-15.
- Pavio, N., S. Battaglia, D. Boucreux, B. Arnulf, R. Sobesky, O. Hermine and C. Brechot (2005). "Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway." Oncogene **24**(40): 6119-32.
- Pavlovic, D., D. C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R. A. Dwek, W. B. Fischer and N. Zitzmann (2003). "The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6104-8.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-5.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager and D. Moradpour (2004). "Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A." J Biol Chem **279**(39): 40835-43.
- Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P. O. Frainais, G. Deleage and J. M. Pawlotsky (2001). "Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment." J Virol **75**(12): 5703-10.
- Pepperkok, R., J. C. Simpson and S. Wiemann (2001). "Being in the right location at the right time." Genome Biol **2**(9): REVIEWS1024.
- Pestova, T. V. and V. G. Kolupaeva (2002). "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection." Genes Dev **16**(22): 2906-22.
- Pianko, S., S. Patella, G. Ostapowicz, P. Desmond and W. Sievert (2001). "Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection." J Viral Hepat **8**(6): 406-13.

- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset and R. Bartenschlager (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7408-13.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand and R. Bartenschlager (2002). "Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture." J Virol **76**(8): 4008-21.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi and S. Abrignani (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
- Plant, E. P., K. L. Jacobs, J. W. Harger, A. Meskauskas, J. L. Jacobs, J. L. Baxter, A. N. Petrov and J. D. Dinman (2003). "The 9-A solution: how mRNA pseudoknots promote efficient programmed -1 ribosomal frameshifting." Rna **9**(2): 168-74.
- Polyak, S. J., K. S. Khabar, D. M. Paschal, H. J. Ezelle, G. Duverlie, G. N. Barber, D. E. Levy, N. Mukaida and D. R. Gretch (2001). "Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response." J Virol **75**(13): 6095-106.
- Pooggin, M. M., T. Hohn and J. Futterer (2000). "Role of a short open reading frame in ribosome shunt on the cauliflower mosaic virus RNA leader." J Biol Chem **275**(23): 17288-96.
- Prince, A. M., B. Brotman, G. F. Grady, W. J. Kuhns, C. Hazzi, R. W. Levine and S. J. Millian (1974). "Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus." Lancet **2**(7875): 241-6.
- Pudi, R., P. Srinivasan and S. Das (2004). "La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation." J Biol Chem **279**(29): 29879-88.
- Qadri, I., M. Iwahashi and F. Simon (2002). "Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3." Biochim Biophys Acta **1592**(2): 193-204.
- Quinkert, D., R. Bartenschlager and V. Lohmann (2005). "Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex." J Virol **79**(21): 13594-605.
- Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer and R. Ray (1996). "Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype." J Virol **70**(7): 4438-43.
- Ray, R. B., R. Steele, K. Meyer and R. Ray (1997). "Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein." J Biol Chem **272**(17): 10983-6.
- Ray, V. L., R. K. Chaudhary and N. Choudhury (2000). "Transfusion safety in developing countries and the Indian scenario." Dev Biol (Basel) **102**: 195-203.
- Reichard, O., J. Andersson, R. Schvarcz and O. Weiland (1991). "Ribavirin treatment for chronic hepatitis C." Lancet **337**(8749): 1058-61.
- Resti, M., C. Azzari, L. Galli, G. Zuin, R. Giacchino, F. Bortolotti, M. Marcellini, M. Moriondo, M. de Martino and A. Vierucci (2002). "Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-

- to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs." *J Infect Dis* **185**(5): 567-72.
- Resti, M., C. Azzari, F. Mannelli, M. Moriondo, E. Novembre, M. de Martino and A. Vierucci (1998). "Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection." *Bmj* **317**(7156): 437-41.
- Reynolds, J. E., A. Kaminski, H. J. Kettinen, K. Grace, B. E. Clarke, A. R. Carroll, D. J. Rowlands and R. J. Jackson (1995). "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation." *Embo J* **14**(23): 6010-20.
- Rigamonti, C., E. Mottaran, E. Reale, R. Rolla, V. Cipriani, F. Capelli, R. Boldorini, M. Vidali, M. Sartori and E. Albano (2003). "Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C." *Hepatology* **38**(1): 42-9.
- Rijnbrand, R., P. J. Bredenbeek, P. C. Haasnoot, J. S. Kieft, W. J. Spaan and S. M. Lemon (2001). "The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs." *Rna* **7**(4): 585-97.
- Rijnbrand, R. C. and S. M. Lemon (2000). "Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication." *Curr Top Microbiol Immunol* **242**: 85-116.
- Roccasecca, R., H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B. B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese and A. Nicosia (2003). "Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2." *J Virol* **77**(3): 1856-67.
- Roussel, J., A. Pillez, C. Montpellier, G. Duverlie, A. Cahour, J. Dubuisson and C. Wychowski (2003). "Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein." *J Gen Virol* **84**(Pt 7): 1751-9.
- Sakai, A., M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell and J. Bukh (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11646-51.
- Sakamuro, D., T. Furukawa and T. Takegami (1995). "Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells." *J Virol* **69**(6): 3893-6.
- Saltoglu, N., Y. Tasova, R. Burgut and I. H. Dundar (1998). "Sexual and non-sexual intrafamilial spread of hepatitis C virus: intrafamilial transmission of HCV." *Eur J Epidemiol* **14**(3): 225-8.
- Sanchez-Tapias, J. M. (1999). "Nosocomial transmission of hepatitis C virus." *J Hepatol* **31 Suppl 1**: 107-12.
- Sasaki, J. and N. Nakashima (1999). "Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro." *J Virol* **73**(2): 1219-26.
- Saunier, B., M. Triyatni, L. Ulianich, P. Maruvada, P. Yen and L. D. Kohn (2003). "Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes." *J Virol* **77**(1): 546-59.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese and A. Vitelli (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *Embo J* **21**(19): 5017-25.

- Schmidt-Puchta, W., D. Dominguez, D. Lewetag and T. Hohn (1997). "Plant ribosome shunting in vitro." Nucleic Acids Res **25**(14): 2854-60.
- Schmunis, G. A., F. Zicker, J. R. Cruz and P. Cuchi (2001). "Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994-1997." Am J Trop Med Hyg **65**(6): 924-30.
- Schuster, C., C. Isel, I. Imbert, C. Ehresmann, R. Marquet and M. P. Kieny (2002). "Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA." J Virol **76**(16): 8058-68.
- Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo and G. N. Pavlakis (1990). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs." J Virol **64**(11): 5448-56.
- Seeff, L. B., E. C. Wright, H. J. Zimmerman and R. W. McCollum (1975). "A cooperative study of post-transfusion hepatitis, 1969-1974: incidence and characteristics of hepatitis and responsible risk factors." Am J Med Sci **270**(2): 355-62.
- Seigneuret, M. (2006). "Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily." Biophys J **90**(1): 212-27.
- Sen, G. C. (2001). "Viruses and interferons." Annu Rev Microbiol **55**: 255-81.
- Serebrov, V. and A. M. Pyle (2004). "Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase." Nature **430**(6998): 476-80.
- Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang and M. M. Lai (2003). "Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2." J Virol **77**(7): 4160-8.
- Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. H. Purcell and H. Yoshikura (1996). "Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy." Hepatology **23**(2): 205-9.
- Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura and T. Miyamura (1999). "Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation." J Virol **73**(12): 9718-25.
- Singh, S., J. Kumar, R. Singh and S. N. Dwivedi (2000). "Hepatitis B and C viral infections in Indian kala-azar patients receiving injectable anti-leishmanial drugs: a community-based study." Int J Infect Dis **4**(4): 203-8.
- Siridechadilok, B., C. S. Fraser, R. J. Hall, J. A. Doudna and E. Nogales (2005). "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis." Science **310**(5753): 1513-5.
- Song, H., P. Mugnier, A. K. Das, H. M. Webb, D. R. Evans, M. F. Tuite, B. A. Hemmings and D. Barford (2000). "The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis." Cell **100**(3): 311-21.
- Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager and M. Niepmann (2006). "The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region strongly enhances Translation directed by the Internal Ribosome Entry Site." J Virol.
- Spahn, C. M., E. Jan, A. Mulder, R. A. Grassucci, P. Sarnow and J. Frank (2004). "Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor." Cell **118**(4): 465-75.

- Spahn, C. M., J. S. Kieft, R. A. Grassucci, P. A. Penczek, K. Zhou, J. A. Doudna and J. Frank (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." Science **291**(5510): 1959-62.
- Spangberg, K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius and S. Schwartz (1999). "The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region." J Hum Virol **2**(5): 296-307.
- Spangberg, K. and S. Schwartz (1999). "Poly(C)-binding protein interacts with the hepatitis C virus 5' untranslated region." J Gen Virol **80** (Pt 6): 1371-6.
- Steinmann, D., H. Barth, B. Gissler, P. Schurmann, M. I. Adah, J. T. Gerlach, G. R. Pape, E. Depla, D. Jacobs, G. Maertens, A. H. Patel, G. Inchauspe, T. J. Liang, H. E. Blum and T. F. Baumert (2004). "Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C." J Virol **78**(17): 9030-40.
- Steinmann, E., G. Koutsoudakis, S. Kallis, F. Penin, R. Bartenschlager and T. Pietschmann (13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, 2006). Role of p7-protein for Hepatitis C virus particle production, Cairns, Australia.
- Sumpter, R., Jr., Y. M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon and M. Gale, Jr. (2005). "Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I." J Virol **79**(5): 2689-99.
- Sun, C. A., H. C. Chen, C. F. Lu, S. L. You, Y. C. Mau, M. S. Ho, S. H. Lin and C. J. Chen (1999). "Transmission of hepatitis C virus in Taiwan: prevalence and risk factors based on a nationwide survey." J Med Virol **59**(3): 290-6.
- Sundararajan, A., W. A. Michaud, Q. Qian, G. Stahl and P. J. Farabaugh (1999). "Near-cognate peptidyl-tRNAs promote +1 programmed translational frameshifting in yeast." Mol Cell **4**(6): 1005-15.
- Sung, V. M., S. Shimodaira, A. L. Doughty, G. R. Picchio, H. Can, T. S. Yen, K. L. Lindsay, A. M. Levine and M. M. Lai (2003). "Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection." J Virol **77**(3): 2134-46.
- Tai, C. L., W. K. Chi, D. S. Chen and L. H. Hwang (1996). "The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)." J Virol **70**(12): 8477-84.
- Takaki, A., M. Wiese, G. Maertens, E. Depla, U. Seifert, A. Liebetrau, J. L. Miller, M. P. Manns and B. Rehermann (2000). "Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C." Nat Med **6**(5): 578-82.
- Takamatsu, K., Y. Koyanagi, K. Okita and N. Yamamoto (1990). "Hepatitis C virus RNA in saliva." Lancet **336**(8729): 1515.
- Tarantino, G., P. Conca, P. Sorrentino and M. Ariello (2006). "Metabolic factors involved in the therapeutic response of patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis." J Gastroenterol Hepatol **21**(8): 1266-8.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, P. R. Romano, G. N. Barber and M. M. Lai (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." Science **285**(5424): 107-10.

- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano and C. M. Rice (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." Nature **435**(7040): 374-9.
- Terrault, N. A. (2002). "Sexual activity as a risk factor for hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S99-105.
- Thomas, D. L., D. Vlahov, L. Solomon, S. Cohn, E. Taylor, R. Garfein and K. E. Nelson (1995). "Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users." Medicine (Baltimore) **74**(4): 212-20.
- Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Kochel and A. Uy (1992). "Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein." Med Microbiol Immunol (Berl) **181**(5): 293-300.
- Thorgeirsson, S. S., J. S. Lee and J. W. Grisham (2006). "Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning." J Hepatol **44**(4): 798-805.
- Thorpe, L. E., L. J. Ouellet, R. Hershow, S. L. Bailey, I. T. Williams, J. Williamson, E. R. Monterroso and R. S. Garfein (2002). "Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment." Am J Epidemiol **155**(7): 645-53.
- Touriol, C., S. Bornes, S. Bonnal, S. Audigier, H. Prats, A. C. Prats and S. Vagner (2003). "Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons." Biol Cell **95**(3-4): 169-78.
- Tovo, P. A., E. Palomba, G. Ferraris, N. Principi, E. Ruga, P. Dallacasa and A. Maccabruni (1997). "Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. Italian Study Group for HCV Infection in Children." Clin Infect Dis **25**(5): 1121-4.
- Triyatni, M., J. Vergalla, A. R. Davis, K. G. Hadlock, S. K. Fong and T. J. Liang (2002). "Structural features of envelope proteins on hepatitis C virus-like particles as determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding." Virology **298**(1): 124-32.
- Troesch, M., E. Jalbert, S. Canobio, M. R. Boulassel, J. P. Routy, N. F. Bernard, J. Bruneau, N. Lapointe, M. Boucher and H. Soudeyns (2005). "Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1." Aids **19**(8): 775-84.
- Tsao, M. L., C. H. Chao and C. T. Yeh (2006). "Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization." Biochem Biophys Res Commun **348**(1): 271-7.
- Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating and C. M. Rice (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." J Virol **80**(4): 1734-41.
- Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto and K. Shimotohno (1997). "Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X." J Virol **71**(9): 6720-6.
- Tsukita, S. and M. Furuse (2000). "The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions." Ann N Y Acad Sci **915**: 129-35.
- Turnbull, J., A. Powell and S. Guimond (2001). "Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator." Trends Cell Biol **11**(2): 75-82.

- Vandelli, C., F. Renzo, L. Romano, S. Tisminetzky, M. De Palma, T. Stroffolini, E. Ventura and A. Zanetti (2004). "Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study." Am J Gastroenterol **99**(5): 855-9.
- Varaklioti, A., N. Vassilaki, U. Georgopoulou and P. Mavromara (2002). "Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome." J Biol Chem **277**(20): 17713-21.
- Vassilaki, N. and P. Mavromara (2003). "Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame." J Biol Chem **278**(42): 40503-13.
- Vassilopoulos, D. and L. H. Calabrese (2005). "Extrahepatic immunological complications of hepatitis C virus infection." Aids **19 Suppl 3**: S123-7.
- Vimaladithan, A. and P. J. Farabaugh (1994). "Special peptidyl-tRNA molecules can promote translational frameshifting without slippage." Mol Cell Biol **14**(12): 8107-16.
- von Hahn, T., B. D. Lindenbach, A. Boullier, O. Quehenberger, M. Paulson, C. M. Rice and J. A. McKeating (2006). "Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells." Hepatology **43**(5): 932-42.
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager and T. J. Liang (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med **11**(7): 791-6.
- Walewski, J. L., T. R. Keller, D. D. Stump and A. D. Branch (2001). "Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame." Rna **7**(5): 710-21.
- Wang, C., M. Gale, Jr., B. C. Keller, H. Huang, M. S. Brown, J. L. Goldstein and J. Ye (2005). "Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication." Mol Cell **18**(4): 425-34.
- Wang, F., I. Yoshida, M. Takamatsu, S. Ishido, T. Fujita, K. Oka and H. Hotta (2000a). "Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 479-84.
- Wang, Q. M., M. A. Hockman, K. Staschke, R. B. Johnson, K. A. Case, J. Lu, S. Parsons, F. Zhang, R. Rathnalam, K. Kirkegaard and J. M. Colacino (2002). "Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." J Virol **76**(8): 3865-72.
- Wang, T. H., R. C. Rijnbrand and S. M. Lemon (2000b). "Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus." J Virol **74**(23): 11347-58.
- Watashi, K., M. Hijikata, M. Hosaka, M. Yamaji and K. Shimotohno (2003). "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." Hepatology **38**(5): 1282-8.
- Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari and K. Shimotohno (2005). "Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase." Mol Cell **19**(1): 111-22.

- Weiner, A. J., C. Christopherson, J. E. Hall, F. Bonino, G. Saracco, M. R. Brunetto, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, S. Venkatakrishna and et al. (1991). "Sequence variation in hepatitis C viral isolates." J Hepatol **13 Suppl 4**: S6-14.
- Weiss, R., D. Lindsley, B. Falahee and J. Gallant (1988). "On the mechanism of ribosomal frameshifting at hungry codons." J Mol Biol **203**(2): 403-10.
- Wellnitz, S., B. Klumpp, H. Barth, S. Ito, E. Depla, J. Dubuisson, H. E. Blum and T. F. Baumert (2002). "Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines." J Virol **76**(3): 1181-93.
- Westin, J., L. M. Lagging, F. Spak, N. Aires, E. Svensson, M. Lindh, A. P. Dhillon, G. Norkrans and R. Wejstal (2002). "Moderate alcohol intake increases fibrosis progression in untreated patients with hepatitis C virus infection." J Viral Hepat **9**(3): 235-41.
- Wilson, J. E., T. V. Pestova, C. U. Hellen and P. Sarnow (2000). "Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome." Cell **102**(4): 511-20.
- Wolk, B., D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." J Virol **74**(5): 2293-304.
- Wood, J., R. M. Frederickson, S. Fields and A. H. Patel (2001). "Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins." J Virol **75**(3): 1348-58.
- World Health Organization (1973). "Viral hepatitis : report of WHO scientific group." Who tech Rep Ser (512): 7-52.
- World Health Organization (1998-1999). "Global database on blood safety ".
- World Health Organization (2002). "Global distribution of hepatitis C, 2001." Weekly epidemiological record **77**(6): 41-48.
- Wu, G. Y., M. Konishi, C. M. Walton, D. Olive, K. Hayashi and C. H. Wu (2005). "A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis." Gastroenterology **128**(5): 1416-23.
- Xie, Z. C., J. I. Riezu-Boj, J. J. Lasarte, J. Guillen, J. H. Su, M. P. Civeira and J. Prieto (1998). "Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews." Virology **244**(2): 513-20.
- Xu, Z., J. Choi, W. Lu and J. H. Ou (2003). "Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum." J Virol **77**(2): 1578-83.
- Xu, Z., J. Choi, T. S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M. J. Selby and J. Ou (2001). "Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift." Embo J **20**(14): 3840-8.
- Yamaga, A. K. and J. H. Ou (2002). "Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein." J Biol Chem **277**(36): 33228-34.
- Ye, J., C. Wang, R. Sumpter, Jr., M. S. Brown, J. L. Goldstein and M. Gale, Jr. (2003). "Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15865-70.

- Yi, M. and S. M. Lemon (2003). "3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA." J Virol **77**(6): 3557-68.
- Yoshinaka, Y., I. Katoh, T. D. Copeland and S. Oroszlan (1985). "Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(6): 1618-22.
- You, S., D. D. Stump, A. D. Branch and C. M. Rice (2004). "A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication." J Virol **78**(3): 1352-66.
- Yu, G. Y., K. J. Lee, L. Gao and M. M. Lai (2006). "Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein." J Virol **80**(12): 6013-23.
- Yueh, A. and R. J. Schneider (1996). "Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells." Genes Dev **10**(12): 1557-67.
- Zannis, V. I., A. Chroni and M. Krieger (2006). "Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL." J Mol Med **84**(4): 276-94.
- Zauli, D., F. Cassani and F. B. Bianchi (1999). "Auto-antibodies in hepatitis C." Biomed Pharmacother **53**(5-6): 234-41.
- Zhang, J., O. Yamada, H. Yoshida, T. Iwai and H. Araki (2002). "Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus." Virology **293**(1): 141-50.
- Zhang, T., R. T. Lin, Y. Li, S. D. Douglas, C. Maxcey, C. Ho, J. P. Lai, Y. J. Wang, Q. Wan and W. Z. Ho (2005). "Hepatitis C virus inhibits intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines." Hepatology **42**(4): 819-27.
- Zhao, X., Z. Y. Tang, B. Klumpp, G. Wolff-Vorbeck, H. Barth, S. Levy, F. von Weizsacker, H. E. Blum and T. F. Baumert (2002). "Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection." J Clin Invest **109**(2): 221-32.
- Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita and F. V. Chisari (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9294-9.
- Zhong, W., A. S. Uss, E. Ferrari, J. Y. Lau and Z. Hong (2000). "De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase." J Virol **74**(4): 2017-22.