



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 Wagane Joseph Antoine BENGA

**Isolement de protéines cellulaires interagissant avec une région
particulière du génome du Virus de l'Hépatite C.
Etude de l'implication de ces interactants sur le cycle viral.**

Présentée et soutenue publiquement le 27 novembre 2008

Membres du Jury:

Directeur de Thèse: Dr Catherine SCHUSTER, CR1 INSERM, HDR, U748, Strasbourg

Rapporteur externe: Dr Glaucia PARANHOS-BACCALA, Chef de projet Biomérieux, Lyon

Rapporteur externe: Dr Violaine MOREAU, CR1 INSERM, HDR, U889, Bordeaux

Rapporteur interne: Pr Philippe GEORGEL, PU, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Examineur: Pr Thomas BAUMERT, PU-PH, Université Louis Pasteur, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui m'ont permis de faire cette thèse. D'abord et avant tout, je veux te remercier Catherine, pour avoir accepté de m'encadrer mais aussi pour ton soutien tout au long de ce travail de recherche. Ta patience et ton expérience sans oublier ta gentillesse m'ont permis de grandir dans mon apprentissage de la biologie moléculaire. Je veux te dire ma profonde reconnaissance. Mes remerciements vont également au Professeur Thomas Baumert, actuel directeur de l'Unité 748 de l'Inserm pour ses conseils avisés et son extraordinaire dynamisme; je lui souhaite plein succès à Strasbourg. Je veux aussi remercier le Dr Anne-Marie Aubertin et le Professeur Françoise Stoll-Keller qui assuraient la direction de l'Institut de Virologie à ma venue et qui ont toujours fait montre d'une grande disponibilité en dépit de leurs nombreuses responsabilités.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame le Dr Paranhos-Baccala Glaucia (Directeur de recherche, BioMérieux SA), à Madame le Dr Moreau Violaine (Chargée de recherches INSERM, Bordeaux) et à Monsieur le Professeur Georgel Philippe (Université Louis Pasteur, Strasbourg I) pour l'honneur qu'ils me font de juger cette thèse malgré des emplois du temps chargés.

Merci à l'ANRS dont le soutien financier a été indispensable pour mener ces travaux.

Je remercie également mes collègues au laboratoire: Marie pour m'avoir aidé dans l'apprentissage des techniques usuelles de biologie moléculaire, Maria pour son expertise dans les aspects cellulaires de notre travail, Christine et Sophie pour leur apport très appréciable. Grand merci à Evelyne et Saadi pour leur disponibilité. Un Merci spécial à Isabel pour sa grande gentillesse et à Joachim, l'Allemand aux stupéfiants progrès en français. Je ne saurais oublier tous les autres membres de l'équipe pour leur soutien dans bien d'autres domaines: Mirjam, Michèle, Samira, Cathy, Mélanie, Céline, les deux Eric, Patrick, Rémy et Romain.

Remerciements aux membres de l'équipe VIH: Christiane, Stella, Géraldine, Sylvie, Vincent, Thomas, les 2 Maryses, Xu Ke, Florent, Alexandre mais aussi au personnel de l'animalerie, Nicolas et Richard ainsi qu'à Jérémie.

Merci à mon cher ami Sigis pour ton grand soutien par tes extraordinaires sérénité et générosité ainsi que pour cette ingéniosité à résoudre les problèmes. Je suis vraiment heureux de t'avoir connu.

Merci à Rosalba, à Fodil et au personnel du diagnostic.

Merci aussi à Joelle et Anne pour leur diligence toute professionnelle.

Je veux très spécialement exprimer ma gratitude à tous les membres de ma famille pour leur amour, leur soutien dans la vie et dans ce travail en particulier. Mon succès est aussi le leur.

Je ne pourrais terminer sans mentionner les responsables du laboratoire de biochimie du Nouvel Hôpital Civil, messieurs les Dr Koehl et Offner, qui ont permis que j'officie en garde de façon à financer ma thèse, puissent-ils trouver dans ces lignes l'expression de mon immense gratitude.

Enfin, merci à toutes ces personnes que je pourrais avoir oubliées, pour leur soutien parfois discret mais non moins apprécié.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
I INTRODUCTION.....	12
I.1 PROPRIETES VIRALES.....	13
I.2 GENERALITES	14
I.3 LE GENOME VIRAL.....	16
I.3.1 La région 5' non traduite ou 5'NTR	17
I.3.2 Le cadre ouvert de lecture.....	19
I.3.3 La région 3' non traduite ou 3'NTR	19
I.4 LES PROTEINES VIRALES.....	21
I.4.1 La protéine Core	21
I.4.2 La protéine F ou ARFP	22
I.4.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	24
I.4.4 p7.....	27
I.4.5 La protéine NS2	28
I.4.6 La protéine NS3	29
I.4.7 La protéine NS4A	33
I.4.8 La protéine NS4B	33
I.4.9 La protéine NS5A	34
I.4.10 La protéine NS5B	35
I.5 METHODES D'ETUDE	36
I.5.1 Modèles animaux	36
I.5.1.1 Le chimpanzé	36
I.5.1.2 Autres modèles.....	37
I.5.2 Les glycoprotéines solubles	37
I.5.3 Les particules de type VHC (HCV-LPs)	38
I.5.4 Les pseudoparticules du VHC (HCVpp)	38
I.5.5 Les réplicons subgénomiques du VHC.....	40
I.5.6 Culture cellulaire du VHC	41
I.6 LE CYCLE VIRAL.....	43
I.6.1 Attachement de la particule virale	44

I.6.1.1 Les glycosaminoglycanes.....	44
I.6.1.2 Le récepteur des LDL.....	44
I.6.1.3 CD81	45
I.6.1.4 SRBI.....	47
I.6.1.5 Les récepteurs de la famille Claudine	48
I.6.2 Internalisation de la particule virale et fusion avec la membrane endosomale.....	49
I.6.3 Traduction de la polyprotéine virale	50
I.6.4 Maturation de la polyprotéine	51
I.6.5 Réplication de l'ARN viral	52
I.6.6 Assemblage et relargage des virions.....	55
I.6.7 VHC et métabolisme lipidique.....	56
I.6.7.1 Réplication du VHC et voie de synthèse du Mevalonate.....	56
I.6.7.2 Assemblage des VLDL et sécrétion du VHC.....	57
I.6.7.3 Récepteurs de lipoprotéines et entrée du virus.....	59
I.6.7.4 VHC et gouttelettes lipidiques	59
I.7 PHYSIOPATHOLOGIE	61
I.7.1 Diagnostic de l'infection par le VHC	61
Infection aiguë	61
Infection chronique.....	62
I.7.1.1 Détection de l'ARN du VHC	62
I.7.1.2 Génotypage du VHC	63
I.7.1.3 Les tests sérologiques.....	63
I.7.1.4 L'infection occulte par le VHC.....	64
I.7.2 Pathogénies associées au VHC	65
I.7.2.1 Cryoglobulinémie mixte (CM).....	65
I.7.2.2 Désordres lymphoprolifératifs.....	66
I.7.2.3 Manifestations dermatologiques	66
I.7.2.4 Manifestations endocriniennes.....	67
I.7.2.5 Manifestations rhumatologiques	68
I.7.3 Immunopathogénèse de l'infection par le VHC	68
I.7.3.1 Réponses immunitaires innées et échappement viral.....	68
I.7.3.2 Réponses immunes cellulaires	70
I.7.3.3 Réponses immunes humorales	75

I.7.3.4 Polymorphismes des gènes de l'hôte	76
I.7.3.5 Cibles extra-hépatiques	78
I.8 LE TRAITEMENT	79
I.8.1 Les thérapies actuelles	79
I.8.2 Thérapies émergentes et cibles antivirales.....	80
II OBJECTIFS DE LA THESE.....	82
III RESULTATS	84
III.1 Introduction.....	85
III.2 Etude de la réplication de mutants de SLEI dans des lignées cellulaires dérivées d'hépatomes humains.	88
III.3 Recherche par triple-hybride d'interactants de SLEI et clones candidats.	89
III.4 Caractérisation des interactions entre les clones candidats et la tige-boucle SLEI	90
III.5 ApoE full-length n'interagit pas avec SLEI.....	92
III.6 Etude de l'implication fonctionnelle d'ApoE dans le cycle viral	93
III.6.1 L'inhibition de l'expression d'ApoE n'a pas d'impact sur la réplication de l'ARN viral Jc1-Luc.....	94
III.6.2 L'inhibition de l'expression d'ApoE limite sévèrement la production de particules infectieuses du VHC.....	95
III.7 NS5A est la seule protéine virale interagissant avec ApoE en double-hybride.....	96
III.8 Confirmation de l'interaction NS5A-ApoE par immunoprécipitation.	97
III.9 ApoE est requis pour la production de particules virales infectieuses	98
III.10 Une délétion dans le domaine III de NS5A perturbe l'interaction avec ApoE.....	100
IV DISCUSSION	101
V PERSPECTIVES	110
VI MATERIELS ET METHODES	114
VI.1 MATERIELS	115
VI.1.1 Levures.....	115
VI.1.1.1 YBZ1	115
VI.1.1.2 Y187	115
VI.1.1.3 AH109	115
VI.1.2 Bactéries.....	115
VI.1.2.1 XL1 blue.....	116
VI.1.2.2 TG1.....	116
VI.1.2.3 KC8	116

VI.1.3 Lignées cellulaires.....	116
VI.1.3.1 Huh7.5	116
VI.1.3.2 Huh7.5.1	116
VI.1.4 Les plasmides.....	117
VI.1.5 Les virus.....	119
VI.1.5.1 JFH1	119
VI.1.5.2 Jc1.....	119
VI.1.5.3 Jc1-Luc	119
VI.1.6 La banque d'ADNc de foie humain	120
VI.1.7 Amorces et plasmides utilisés.....	120
VI.2 METHODES	123
VI.2.1 Culture, Transformation et Manipulation de cellules	123
VI.2.1.1 Culture	123
VI.2.1.2 Transformation	124
VI.2.2 Utilisation du triple-hybride dans la levure.....	126
VI.2.2.1 Principe du triple-hybride.....	126
VI.2.2.2 Criblage d'une banque d'ADNc.....	127
VI.2.3 Utilisation du double-hybride dans la levure	129
VI.2.3.1 Principe du double-hybride	129
VI.2.3.2 Protocole expérimental.....	129
VI.2.4 Test en gouttes	130
VI.2.5 Méthodes relatives à l'ADN	130
VI.2.5.1 PCR	130
VI.2.5.2 Digestion et modification enzymatique de l'ADN.....	130
VI.2.5.3 Extraction et purification d'ADN.....	131
VI.2.5.4 Mutagenèse dirigée	132
VI.2.6 Méthodes relatives à l'ARN.....	132
VI.2.6.1 Transcription d'ARN in vitro	132
VI.2.6.2 RT PCR	133
VI.2.7 Méthodes relatives aux protéines.....	133
VI.2.7.1 Quantification des protéines totales.	133
VI.2.7.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	134
VI.2.7.3 Western Blot.....	134

VI.2.7.4 Mesure de l'activité β -galactosidase	135
VI.2.7.5 Mesure de l'activité luciférase	135
VI.2.7.6 Co-Immunoprécipitation de protéines.....	136
VII BIBLIOGRAPHIE.....	137
VIII ANNEXE: Résultats soumis à publication.....	179

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
AD	Activation Domain
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARFP	Alternate Reading Frame Protein
ApoAI	Apolipoprotéine AI
ApoAII	Apolipoprotéine AII
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoC	Apolipoprotéine C
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
3 AT 3	Aminotriazole
BVDV	Virus de la diarrhée bovine
CD	Cluster of Differentiation
CLDN1	Claudine 1
CMH I	Complexe d'histocompatibilité majeur de classe I
CMH II	Complexe d'histocompatibilité majeur de classe II
CMV	Cytomégalovirus
C-term	Carboxy-terminal
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DBD	DNA Binding Domain
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GBV-B	GB virus-B
GFP	Green Fluorescent Protein
HDL	High Density Lipoproteins
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
HS	Héparanes Sulfates
HSPG	Héparanes Sulfates Protéoglycanes de surface
HVR	Hyper Variable Region
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IFN	Interféron
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ISG	Interferon Stimulated Genes
I- κ B	Inhibiteur de NF- κ B
JFH-1	Japanese Fulminant Hepatitis-1

kDa kiloDaltons
LD Lipid Droplets
LDL Low Density Lipoproteins
LDLr Récepteur des LDL
LEL Large Extracellular Loop
LTR Long Terminal Repeat
Luc Luciférase
NIH National Institute of Health
NLS Nuclear Localization Signal
NS protéine Non Structurale
nt nucleotide
NTR Non Translated Region
OMS Organisation Mondiale de la Santé
O/N Overnight
ORF Open Reading Frame
PAMP Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS Phosphate Buffered Solution
PCR Polymerase Chain Reaction
PEG Polyéthylène Glycol
PKR Protéine Kinase R
PPS Peptidase à Peptide Signal
PS Peptidase Signal
RE Réticulum Endoplasmique
RIG Retinoic acid Inductible Genes
rpm rotation par minute
S. cerevisiae Saccharomyces cerevisiae
SEL Small Extracellular Loop
siRNA small interfering RNA
SL Stem-Loop
SNP Single Nucleotide Polymorphism
SR-B1 Scavenger Receptor class B type 1
STAT-C Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV
SV40 Simian Virus 40
TNF Tumor Necrosis Factor
UAS Upstream Activating Sequence
VHA Virus de l'Hépatite A
VHB Virus de l'Hépatite B
VHC Virus de l'Hépatite C
VHCcc VHC en culture cellulaire
VHC-LP VHC-Like Particles

VHCpp VHC pseudo-particles
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL Very Low Density Lipoproteins
YFV Virus de la fièvre jaune
WNV Virus du Nil occidental

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Modèle et microscopie électronique des LVP	13
Figure 2: Organisation génomique et produits des gènes du VHC	16
Figure 3: Modèle des structures secondaires et tertiaires de la région 5' non traduite du génome du VHC	18
Figure 4: Structure secondaire de l'extrémité 3' non traduite du génome du VHC.....	20
Figure 5: Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC avec leurs sites de glycosylation.	24
Figure 6: Organisation génomique et maturation de la polyprotéine	27
Figure 7: Déclenchement de l'activation d'IRF-3 par le VHC via RIG-I ou TLR-3 et contrôle de la signalisation par NS3/4A.	30
Figure 8: Structures de l'hélicase du VHC.....	32
Figure 9: Production de pseudoparticules du VHC	39
Figure 10: Structure des réplicons subgénomiques du VHC.....	40
Figure 11: Génération de virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectivité <i>in vivo</i>	42
Figure 12: Le cycle viral du VHC.	43
Figure 13: Représentation schématique de SR-BI, CD81 et CLDN1	46
Figure 14: Réquisition de la voie de synthèse du Mevalonate pour la réplication du VHC	57
Figure 15: Le VHC se réplique dans des membranes du RE impliquées dans l'assemblage des VLDL et est sécrété avec les VLDL.....	58
Figure 16: Micrographie électronique d'une biopsie hépatique mettant en évidence une gouttelette lipidique.	60
Figure 17: Modèle pour la production de virions infectieux du VHC.....	60
Figure 18: Représentation schématique de la structure des domaines I et II de l'extrémité 3' du brin (-) du VHC.	86
Figure 19: Représentation schématique des brins (-) et (+) du VHC.....	87
Figure 20: Etude de la réplication des mutants des tiges-boucles SLEI et SLII dans Jc1.....	89
Figure 21: Tableau récapitulatif de la pousse des interactants de SLEI (WT ou RM).....	90

Figure 22: Le C-terminal d'ApoE interagit spécifiquement avec SLEI.....	91
Figure 23: Le C-term d'ApoE interagit spécifiquement avec SLEI et SLII.....	92
Figure 24: Analyse par Immunoblot de l'inhibition de l'expression d'ApoE par des ARN interférents spécifiques dans les cellules Huh7.5.	93
Figure 25: L'inhibition de l'expression d'ApoE n'affecte pas la réplication de Jc1-Luc.	94
Figure 26: L'inhibition de l'expression d'ApoE entraîne un blocage de la production de particules virales.	95
Figure 27: NS5A est la seule protéine du VHC qui interagit avec ApoE	97
Figure 28: ApoE et NS5A interagissent dans des cellules Huh7.5 répliquant Jc1	98
Figure 29: Infectivité des virions intracellulaires ou extracellulaires du VHC purifiés au moyen de gradients d'iodixanol.	99
Figure 30: Une mutation du domaine III de NS5A est délétère pour l'interaction avec ApoE	100
Figure 31: Structure tridimensionnelle des régions spécifiques des isoformes d'ApoE.....	105
Figure 32: Différences d'interaction de Core avec NS5A selon le génotype.....	108
Figure 33:Modèle du rôle d'ApoE dans l'export des virions du VHC.....	109
Figure 34: Structure du réplicon génomique JFH1 de génotype 2a.	119
Figure 35: Structure du réplicon génomique intragénotypique Jc1.....	119
Figure 36: Organisation génétique de Jc1-Luc.....	120
Figure 37: Schéma de la stratégie du triple-hybride pour la détection d'interaction ARN-protéine.	127
Figure 38: Schéma de la stratégie du double-hybride pour l'étude de l'interaction entre deux protéines.	129

I INTRODUCTION

I.1 PROPRIETES VIRALES

Le virus de l'hépatite C (VHC) est de la famille des Flaviviridae, c'est l'unique membre du genre hepacivirus (Robertson et al., 1998). Cette famille comprend également le genre flavivirus comportant les virus de la fièvre jaune et de la dengue et le genre pestivirus regroupant les virus de la diarrhée virale bovine, de la peste porcine classique et de la maladie de Border. Le VHC est un petit virus enveloppé dont les particules adoptent une structure icosaédrique classique (Kaito et al., 1994) d'environ 55-65 nm de diamètre. Il circule dans le sérum des patients infectés, lié aux VLDL (Very-Low-Density lipoproteins) et aux immunoglobulines (appelées particules lipovirales ou LVP) (**Figure 1**) ou sous forme libre (Andre et al., 2002; Andre et al., 2005).

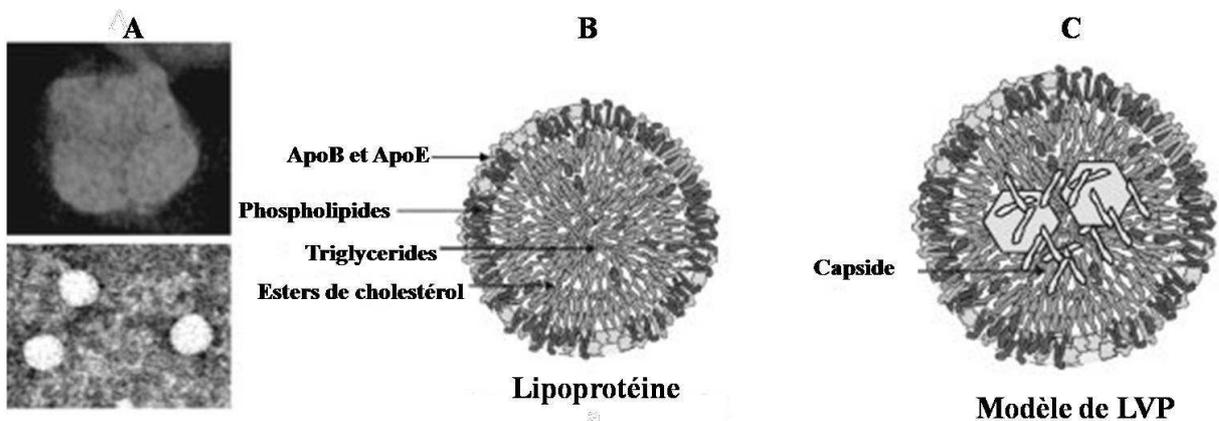


Figure 1: Modèle et microscopie électronique des LVP

(A) En microscopie électronique, les LVP sont des particules sphériques de plus de 100 nm de diamètre (photo du haut). Après délipidation des LVP, des structures de 30 à 40 nm ressemblant à des capsides virales sont observées (photo du bas). (B) Modèle de lipoprotéine contenant ApoB. Les chylomicrons, les VLDL et LDL sont constitués d'un cœur de lipides neutres, triglycérides et esters de cholestérol entourés d'une monocouche de phospholipides dans laquelle résident ApoB et éventuellement ApoE. (C) Modèle de LVP établi sur la base des données morphologiques et biochimiques. Les LVP ressemblent aux lipoprotéines à ApoB mais sont plus grosses et contiennent des capsides virales dans le cœur lipidique. Adapté de (Andre et al., 2005).

Le génome du VHC consiste en une molécule d'ARN simple brin de 9,6 kb de polarité positive. Il comprend un cadre de lecture ouvert (ORF) majeur, bordé par des régions 5' et 3' non traduites (NTR). Les séquences de la partie 5'NTR contiennent un site interne d'entrée du ribosome (IRES) qui permet une traduction coiffe-indépendante et la production d'une polyprotéine. La partie 3'NTR quant à elle est cruciale pour la réplication virale avec une

structure tripartite constituée d'une région variable, une région riche en pyrimidines et une région 3'X hautement conservée (Reed and Rice, 2000). L'ORF code un précurseur polyprotéique de 3030 acides aminés qui est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases virales et cellulaires, en protéines structurales (Core, E1, E2 et p7) et non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Un ORF alternatif chevauchant le cadre de lecture de la protéine Core est accessoirement traduit (Xu et al., 2001). La protéine résultante est connue comme la protéine frameshift (F) ou alternative reading frame protein (ARFP) (Xu et al., 2001; Xu et al., 2003; Wolf et al., 2008).

Le génome du VHC présente une forte hétérogénéité, due d'abord à son fort taux de réplication et à son ARN polymérase ARN-dépendante dépourvue d'activité de correction. Du fait de sa variabilité génétique, le VHC est classifié en quatre divisions hiérarchiques: génotypes, sous-génotypes, isolats et quasiespèces. Ainsi les isolats du VHC, dont le nombre excède 90, sont classés en six génotypes (1 à 6) et en plus de 5 sous-types (a,b,c...), dont les séquences nucléotidiques divergent d'environ 30% (Farci and Purcell, 2000). Ces différents génotypes ne varient pas significativement dans leur pathogénicité, les manifestations cliniques qu'ils provoquent et l'issue de la maladie mais diffèrent fortement par leur distribution géographique et la réponse au traitement par l'interféron (Farci and Purcell, 2000)

I.2 GENERALITES

On a pensé pendant de longues années que les virus des hépatites A et B étaient les seuls agents de maladies hépatiques virales. L'hépatite C ne fut reconnue comme telle que dans le milieu des années 70 après la mise au point de tests diagnostiques sensibles et spécifiques. Elle fut alors présentée comme l'hépatite parentérale non-A, non-B. Le virus non encore identifié était principalement étudié chez le chimpanzé. En 1989, le groupe de Michael Houghton (Chiron Corporation, Emeryville, Californie, USA) isola le premier une partie du génome du VHC par l'immunocriblage d'une banque d'ADNc dérivé du plasma d'un chimpanzé développant une hépatite chronique après infection par le sérum d'un patient (Choo et al., 1989). Suite à cette première, un test diagnostique de l'infection par le VHC basé sur la détection par un anticorps anti-VHC d'un antigène non-structural a vu le jour (Kuo et al., 1989). Aujourd'hui, des systèmes de détection de seconde et troisième génération utilisant des antigènes recombinants du VHC et la RT-PCR sont utilisés pour un meilleur dépistage de l'infection (Kato, 2001).

Depuis sa découverte, l'infection par le VHC est devenue un problème de santé publique à l'échelle de la planète. Selon l'OMS, quelque 170 millions de personnes sont infectées par le VHC au niveau mondial soit une séroprévalence d'environ 3% qui le place devant le VIH (34 millions en 2007, source OMS). En France métropolitaine, en 2004, le pourcentage de personnes âgées de 18 à 80 ans présentant des anticorps anti-VHC positifs était estimé à 0,84 %, soit 370 000 personnes (enquête nationale 2003-2004 auprès d'assurés sociaux, Institut de veille sanitaire). Mais ces chiffres pourraient être sous-évalués du fait du caractère souvent asymptomatique de l'infection. Les politiques de prévention et de sensibilisation ont permis d'observer une chute du nombre de personnes nouvellement infectées qui se recrutent désormais essentiellement dans les groupes à risque tels que les héroïnomanes.

Plus de 80% des personnes infectées développent une hépatite chronique. Les 10 à 20% restants éliminent spontanément le virus par leur immunité naturelle. Seulement 20% des sujets infectés développent une hépatite aiguë qui est rarement sévère. La majorité des patients développent une infection chronique asymptomatique; mais 60 à 80% vont présenter un tableau d'hépatite chronique objectivé par une élévation de l'alanine aminotransférase (ALT). Environ 30% maintiennent des taux normaux d'ALT malgré une virémie positive. Un tiers des patients infectés chroniquement vont développer progressivement des lésions hépatiques, une fibrose et une cirrhose voire un hépatocarcinome au bout de 20 à 30 ans (Roudot-Thoraval et al., 1997; Zoulim et al., 2003). Des études ont mis en évidence l'influence de facteurs additionnels tels que l'âge où l'infection est contractée particulièrement chez les plus de 40 ans, le sexe mâle, l'alcoolisme chronique, la co-infection par le VHB ou le VIH, la stéatose, l'état d'immunodépression comme favorisant la persistance du virus avec progression vers la fibrose et le développement d'une cirrhose. Chez les patients avec une cirrhose, l'incidence du carcinome hépatocellulaire est de 2-5% par an (Thomson and Finch, 2005).

La transmission virale se fait essentiellement par contact direct avec du sang ou du matériel infectés. On peut citer les transfusions sanguines, la transmission mère-enfant, l'utilisation de seringues infectées par les toxicomanes, le piercing et les tatouages. Le risque de transmission par voie sexuelle est faible mais renforcée par d'éventuelles lésions de la sphère génitale. On pense aussi que d'autres facteurs tels que la charge virale, la variabilité des quasi-espèces (variants génétiques du virus infectant originel), l'état immunitaire du patient pourraient influencer défavorablement la sévérité et la progression de l'infection (Thomson and Finch, 2005). On utilise actuellement pour le traitement deux molécules: INF α et Ribavirine seules ou en association selon la symptomatologie et l'état clinique. De nouveaux composés sont à

l'étude du fait des limites des molécules précitées. En effet, seulement 50% des patients sont répondeurs au traitement avec une moindre efficacité dans les génotypes 1 et 4. On observe en outre des effets indésirables à titre d'anémie, de syndrome pseudo-grippal et de dépression (Cholongitas and Papatheodoridis, 2008).

I.3 LE GENOME VIRAL

Le génome viral est un ARN monocaténaire, de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Il possède deux cadres de lecture. Le premier est flanqué de deux régions non traduites 5' et 3' (Nontranslated Regions NTR). Le produit de synthèse majoritaire est une polyprotéine de 3008 à 3037 acides aminés (aa) selon le génotype (Chamberlain et al., 1997a; Chamberlain et al., 1997b). Le deuxième produit de synthèse, identifié récemment, code pour la protéine F d'environ 160 aa (Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001; Varaklioti et al., 2002; Xu et al., 2003; Wolf et al., 2008). L'organisation génomique du VHC est illustrée à la **Figure 2a**.

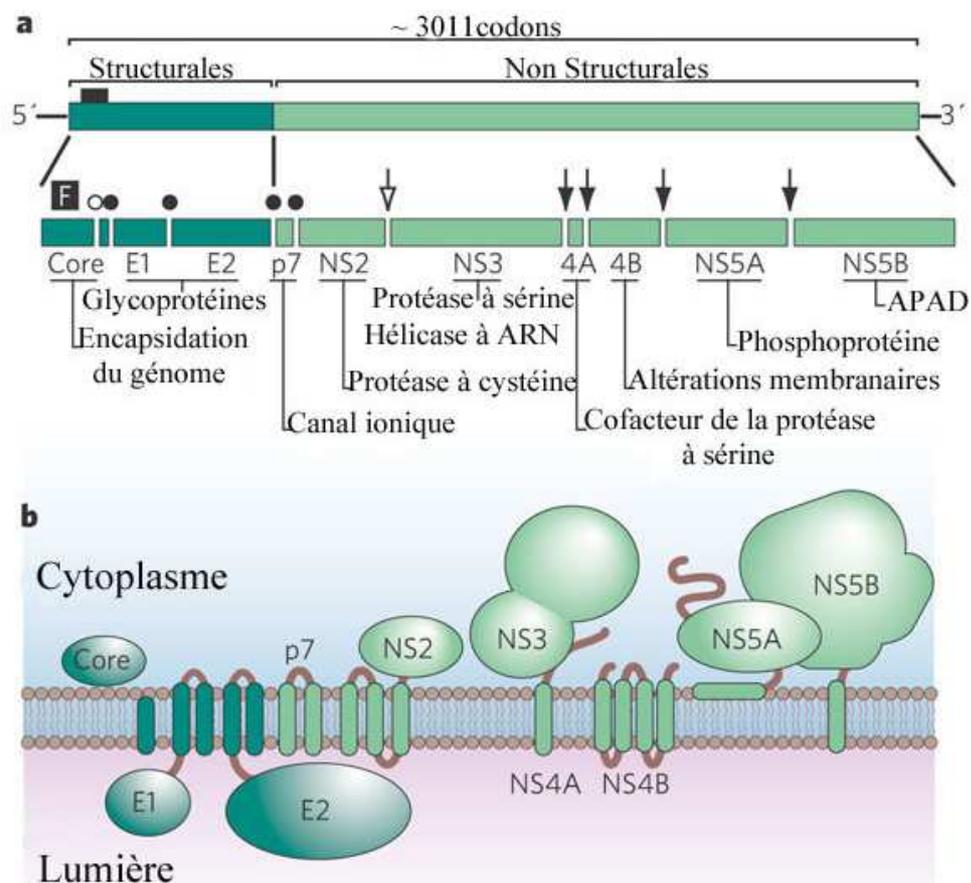


Figure 2: Organisation génomique et produits des gènes du VHC

a Organisation du génome viral avec un grand cadre de lecture codant les protéines structurales et non structurales, bordé par des extrémités 5' et 3' non traduites. Au-dessous, le schéma de la maturation de la polyprotéine. Les cercles fermés correspondent aux sites de clivage de la peptidase signal, les cercles ouverts au site de clivage de la peptidase à peptide signal. **b** Topologie des protéines structurales et non structurales par rapport à la membrane cellulaire. Adapté de (Lindenbach and Rice, 2005)

I.3.1 La région 5' non traduite ou 5'NTR

Cette région d'environ 341 nt est la plus conservée du génome. La variabilité des séquences n'excède pas les 10% entre les sous-types apparentés les plus éloignés. Sa structure secondaire présente des similitudes avec celle des pestivirus voisins que sont BVDV, BDV, CSFV. La séquence nucléotidique de cette région diffère du BVDV et du CSFV d'environ 50% mais ces substitutions sont essentiellement des transitions et indiquent que les structures secondaire et tertiaire sont conservées (Hellen and Pestova, 1999). Elle se replie pour former un site interne d'entrée du ribosome ou IRES, mécanisme alternatif permettant l'initiation de la traduction (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). La structure de cet IRES initialement prédite par des comparaisons phylogénétiques et des analyses de modélisation informatique fut confirmée par des expériences de mutagenèse et de cartographie par des sondes chimiques et enzymatiques (Brown et al., 1992; Wang et al., 1995; Honda et al., 1996). Elle est structurée en quatre domaines majeurs numérotés de I à IV auxquels s'ajoute un pseudo-noeud en amont du codon d'initiation de la traduction. (**Figure 3**). L'IRES comprend les domaines II, III et IV du 5'NTR et les 24 à 40 premiers nucléotides de la séquence codante de Core. L'efficacité de la traduction dépend de la séquence en aval du site d'initiation de la traduction (Reynolds et al., 1995; Honda et al., 1996). Le domaine I ne fait pas partie de l'IRES et serait plutôt impliqué dans la réplication de l'ARN. Les domaines II et III sont quant à eux hautement structurés en tige-boucles et indispensables à l'intégrité de l'IRES. Des mutations mêmes mineures de ces domaines et particulièrement du pseudo-noeud réduisent substantiellement l'activité de l'IRES. Celles-ci peuvent dans certains cas être corrigées par des mutations compensatoires qui vont restaurer la structure et l'activité (Hellen and Sarnow, 2001). Le domaine IV est constitué d'une tige-boucle qui contient le codon initiateur AUG. Tant la séquence (Fletcher et al., 2002) que la stabilité de l'ARN (Honda et al., 1996) sont indispensables pour une traduction efficace, elles permettent un positionnement approprié du codon d'initiation.

L'IRES du HCV interagit avec de nombreux facteurs cellulaires: polypyrimidin tract-binding protein (PTB) (Ito et al., 1998; Beales et al., 2001), Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNPL) (Hahm et al., 1998b), La autoantigen (Ali et al., 2000; Pudi et al., 2003), eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) (Buratti et al., 1998; Sizova et al., 1998), et la sous-unité 40S du ribosome (Lytle et al., 2002; Otto et al., 2002). Le site d'interaction de la sous-unité 40S du ribosome avec l'IRES a été cartographié par la technique des empreintes au niveau des domaines II et III (Fukushi et al., 1997; Sizova et al., 1998).

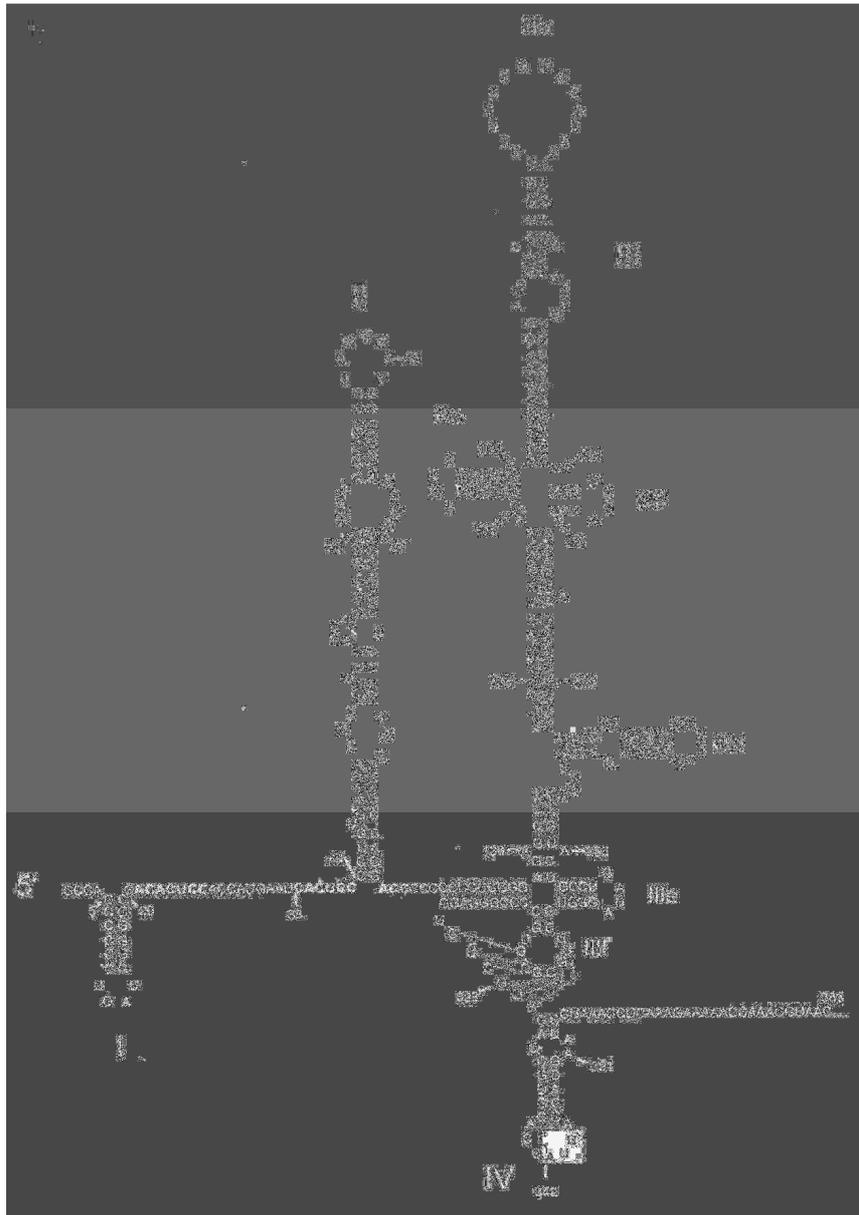


Figure 3: Modèle des structures secondaires et tertiaires de la région 5' non traduite du génome du VHC

Les domaines structuraux majeurs sont numérotés I à IV. Les appariements de bases dans le pseudo-nœud (boucle IIIb) sont indiqués par des lignes solides. Le codon AUG en gras au nucléotide 342 est le site d'initiation de la traduction de la polyprotéine. Adapté de (Rijnbrand et al., 2000)

La portion basale du domaine III en particulier a une forte affinité pour la sous-unité 40S puisque sa séquence est complémentaire à celle de l'ARNr 18S (Kolupaeva et al., 2000; Kieft et al., 2001; Lytle et al., 2002), tandis que le domaine II interagit avec la protéine ribosomale 5S de la même sous-unité (Fukushi et al., 2001b), ce qui favoriserait son positionnement dans le site actif du ribosome permettant les changements conformationnels indispensables à

l'initiation de la traduction. eIF3 se lie à la boucle interne III_d et à une hélice adjacente comme démontré au travers d'une analyse structurale par mutagenèse et au moyen de sondes chimiques (Collier et al., 2002). La protéine La autoantigène, une hélicase de 52 kDa interagit *in vivo* et *in vitro* avec le domaine IV près du codon d'initiation (Ali and Siddiqui, 1997). Il a aussi été montré que la protéine La favorisait la liaison de la sous-unité 40S du ribosome aux IRES du HCV et du poliovirus (Pudi et al., 2004). De façon similaire, la PTB, une protéine de 54 kDa intervenant dans l'épissage des ARN interagit avec l'extrémité 5'NTR. Cette protéine est indispensable pour l'initiation interne de plusieurs picornavirus dont le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) (Niepmann, 1996). Toutefois, son effet sur l'IRES du VHC est sujet à controverses. Des résultats contradictoires montrent que la surexpression du PTB augmente la traduction de systèmes monocistroniques contrôlés par un IRES tandis qu'il n'a aucun effet sur d'autres systèmes modèles. Il a aussi été montré par la méthode des double hybride que la PTB interagissait avec la hnRNPL (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L), une autre protéine liant l'IRES de VHC (Hahm et al., 1998a). Cette interaction se fait avec le domaine IV et une partie de la séquence codant la protéine Core. Le même groupe a démontré que la force de liaison de la hnRNPL à l'IRES du VHC est corrélée à l'efficacité de traduction et suggère que l'interaction entre hnRNPL et l'ARN du VHC favorise des changements conformationnels dans l'extrémité 5'NTR nécessaires au recrutement de la machinerie traductionnelle (Hahm et al., 1998b).

I.3.2 Le cadre ouvert de lecture

La polyprotéine précurseur néosynthétisée d'environ 3000 acides aminés est clivée co et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales en protéines structurales (S) et non structurales (NS). (**Figure 2b**). Les protéines structurales sont localisées dans le premier tiers amino-terminal (N-terminal). Ce sont respectivement la protéine de capsid Core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. La partie carboxy-terminale code un petit polypeptide p7 et les protéines non structurales (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

De plus, l'existence d'une nouvelle protéine virale produite par un mécanisme de traduction alternatif de la séquence codante de Core (frameshift) a été décrite (Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001; Varaklioti et al., 2002; Xu et al., 2003; Wolf et al., 2008).

I.3.3 La région 3' non traduite ou 3'NTR

La partie 3'NTR consiste en une structure tripartite comportant une région variable de 40 à 290 nucléotides selon les géotypes, une séquence interne poly(U/UC) de longueur variable

(20 à 200 nucléotides) selon les génotypes et une partie hautement conservée de 98 nucléotides nommée région X. **(Figure 4)**. La partie 3'NTR a une structure secondaire stable révélée par des analyses informatiques de prédiction de structure et par des études utilisant des sondes chimiques et enzymatiques.

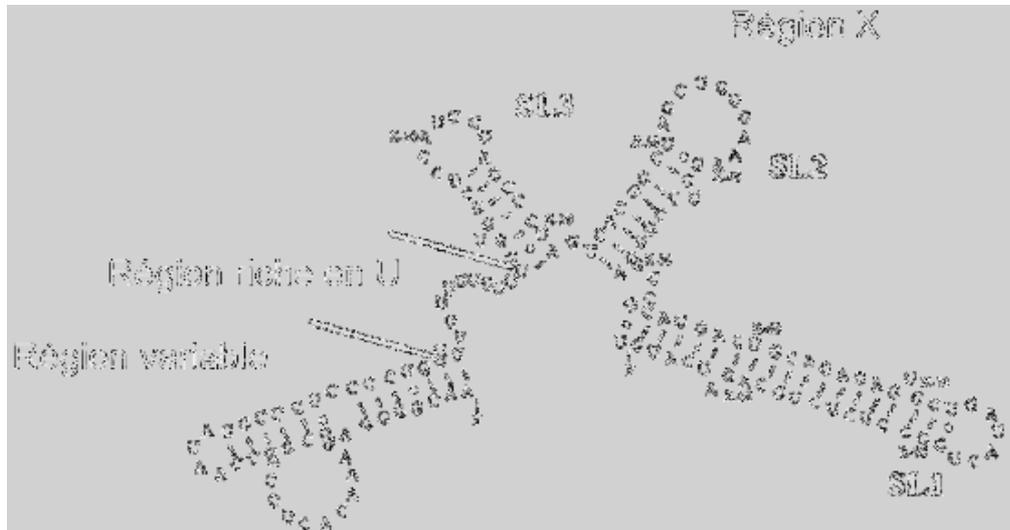


Figure 4: Structure secondaire de l'extrémité 3' non traduite du génome du VHC.

L'extrémité 3' non traduite du génome du VHC comporte de 5' en 3' une région variable, une région riche en U et une région conservée X de 98 nt consistant en trois tiges-boucles SL3, SL2 et SL1. Adapté de (Ito and Lai, 1997).

On dénombre deux tiges-boucles stables dans la région variable (VSL1 et VSL2), et trois tiges-boucles stables dans la région X (SL1, SL2 et SL3) (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1996; Yamada et al., 1996; Blight and Rice, 1997; Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002). Deux études menées chez le chimpanzé montrent que la région variable n'est pas nécessaire au pouvoir infectieux (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000). La région X et une portion minimale de la queue de polypyrimidines sont indispensables pour la réplication de l'ARN en culture cellulaire et *in vivo* (Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003). La fonction de la région 3'NTR dans la réplication a fait l'objet de nombreuses investigations. Il est admis que l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B reconnaît les séquences terminales de la partie 3'NTR pour l'initiation spécifique de la transcription de l'ARN et la génération du brin de polarité négative (Ito and Lai, 1997; Friebe et al., 2005). De nombreuses protéines interagissent avec la partie 3'NTR notamment la PTB, l'autoantigène La et plusieurs protéines ribosomales (Ito and Lai, 1997; Tsuchihara et al., 1997; Chung and Kaplan, 1999; Gontarek et al., 1999; Luo,

1999; Spangberg et al., 1999; Wood et al., 2001). La protéine La est essentielle pour une réplication efficace alors que la PTB la réprime partiellement du fait d'une compétition avec la NS5B pour la liaison de l'extrémité 3'NTR (Domitrovich et al., 2005). L'implication de cette région dans la traduction est controversée du fait des résultats contradictoires des études qui ont été menées. Les unes rapportant une influence positive (Ito et al., 1998; Ito and Lai, 1999; Song et al., 2006), d'autres aucune (Fang and Moyer, 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Imbert et al., 2003) voire un impact négatif (Murakami et al., 2001). Des travaux rapportent la stabilisation de l'ARN et la stimulation de la traduction *in vitro* et dans les cellules transfectées par les interactions respectives de La et de PTB avec l'extrémité 3'NTR (Ito et al., 1998; Spangberg et al., 2001).

I.4 LES PROTEINES VIRALES

I.4.1 La protéine Core

La protéine Core est la première clivée à partir de la polyprotéine par une peptidase de la cellule hôte d'abord en une forme immature qui est ensuite maturée. Elle est relativement bien conservée dans les différents isolats et génotypes comparée à d'autres protéines du VHC. L'analyse de la séquence peptidique révèle 2 parties: une région N-terminale (1-120) hydrophile riche en arginines et en lysines et une région C-terminale où prédominent les acides aminés hydrophobes, permettant l'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique. Elle subit un processus de maturation dans le réticulum endoplasmique produisant plusieurs isoformes dont les tailles vont de 16 à 23 kDa (Lai and Ware, 2000). On a d'abord un clivage par une peptidase à peptide signal cellulaire à la position 191 générant la forme p23 dont le domaine C-terminal hydrophobe agit comme un peptide signal potentiel. Puis la séquence signal de 13 à 18 résidus est à son tour clivée, générant la forme mature prédominante p21 de Core longue de 173 aa (Liu et al., 1997; Yasui et al., 1998). Bien qu'initialement localisée dans les membranes d'organelles cytoplasmiques, elle a aussi été trouvée dans le noyau (Suzuki et al., 1995; Liu et al., 1997; Yasui et al., 1998) et la mitochondrie (Moriya et al., 1998; Okuda et al., 2002). On pense que les amas d'acides aminés basiques de Core fonctionnent comme des signaux de localisation nucléaire qui permettent sa translocation vers le noyau (McLauchlan, 2000). Dans le cytoplasme, Core s'associe aux gouttelettes lipidiques par son extrémité C-terminale où elle colocalise avec l'apolipoprotéine AII (Barba et al., 1997) mais surtout y recrute les protéines non structurales et les complexes de réplication dans un mécanisme essentiel pour la production de virus infectieux (Miyanari et al., 2007). Une autre équipe montre que Core induit la redistribution des gouttelettes lipidiques en

présence de dynéine et de microtubules (Boulant et al., 2008) et que le blocage de l'interaction de Core avec les gouttelettes lipidiques empêche la production de particules virales (Boulant et al., 2007). Enfin, l'interaction de Core avec NS5A serait requise pour la production de particules virales infectieuses (Masaki et al., 2008). Ces observations suggèrent que l'association de Core aux gouttelettes lipidiques est essentielle pour la morphogénèse du virion.

Core apparaît comme une protéine multifonctionnelle qui assure de nombreuses fonctions dans la cellule hôte. Elle joue un rôle central dans l'empaquetage de l'ARN viral (Kunkel et al., 2001). Elle module également de nombreux processus cellulaires, dont les voies de transduction du signal, le contrôle de la transcription, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme lipidique et la réponse immune (Giannini and Brechot, 2003). Elle a aussi un pouvoir transformant sur certaines cellules (Ray et al., 1996). Les souris transgéniques exprimant la protéine Core du VHC développent une stéatose (Moriya et al., 1997) et plus tard un hépatocarcinome (Moriya et al., 1998) suggérant un rôle crucial de cette protéine dans l'hépatocarcinogénèse. Core interagit avec de nombreuses protéines virales notamment avec la glycoprotéine d'enveloppe E1 dans le RE pour la formation de la nucléocapside et l'assemblage du virion. Elle interagit aussi avec la partie C-terminale de NS5B *in vivo*. Ce résultat suggère que cette liaison pourrait être une étape importante pour la reconnaissance spécifique de l'ARN viral par la protéine NS5B ou pourrait intervenir dans la régulation de la réplication (Uchida et al., 2002). Enfin, la forte basicité de la protéine Core permet son interaction avec l'ARN du VHC, plus précisément avec la partie 5'NTR pour l'encapsidation du génome viral *in vitro* (Fan et al., 1999).

I.4.2 La protéine F ou ARFP

La séquence codant la protéine Core du VHC comporte une autre séquence codante dans le cadre de lecture +1. Cette séquence chevauchante code une protéine nommée ARFP (pour Alternative Reading Frame Protein) (Walewski et al., 2001) ou F (pour Frameshift protein) (Xu et al., 2001) ou Core + 1 (pour décrire le cadre de lecture de cette nouvelle protéine) (Varaklioti et al., 2002). Elle est exprimée dans le cours naturel de l'infection par le VHC et stimule les réponses lymphocytaires B et T (Xu et al., 2001; Bain et al., 2004; Komurian-Pradel et al., 2004). Plusieurs mécanismes dont le décalage du cadre de lecture par le ribosome ou l'initiation interne de la traduction ont été proposés pour expliquer l'expression de cette protéine (Boulant et al., 2003; Vassilaki and Mavromara, 2003; Baril and Brakier-Gingras, 2005). En ce qui concerne la première théorie, le décalage se produirait au voisinage

du codon 10 de la séquence codant Core pour produire la protéine ARFP/F avec une séquence leader de 10 aa dérivés de Core. Alternativement, le décalage pourrait aussi se produire au codon 42 et au codon de terminaison de la séquence codant ARFP/F pour produire une protéine chimérique avec les séquences protéiques de Core à ses extrémités N et C terminales. Dans le second cas, l'initiation interne de la synthèse de la protéine ARFP/F pourrait avoir lieu au niveau d'un codon non-canonique à la position 26 (Baril and Brakier-Gingras, 2005) ou au niveau des codons méthionine 86 et 88 (Vassilaki and Mavromara, 2003) résultant en une protéine ARFP/F tronquée. La séquence codant ARFP/F est conservée dans différents génotypes du VHC quoique sa longueur varie en fonction du génotype (Xu et al., 2001). Cette protéine est très instable et localisée dans le cytoplasme, particulièrement dans la région périnucléaire en association avec les membranes du RE (Xu et al., 2003). Malgré le chevauchement de leurs séquences, ces deux protéines ne paraissent pas partager les mêmes activités biologiques (Basu et al., 2004). Ainsi, l'ARFP/F ne module pas significativement les activités de c-Myc, hTERT et du promoteur p53 pas plus qu'elle n'inhibe l'apoptose médiée par le TNF α des cellules HepG2 ni ne promeut la croissance des fibroblastes embryonnaires de rat. Néanmoins comme Core, elle supprime l'expression de p21 l'inhibiteur des cdk (Basu et al., 2004).

Le rôle de l'ARFP dans le cycle de vie et/ou la pathogénèse du VHC n'est pas encore clairement établi mais il ne faut pas exclure qu'elle soit responsable d'effets attribués à la protéine Core. En effet, plusieurs études visant à déterminer la fonction de Core ont utilisé des séquences contenant probablement les deux protéines. Ainsi, des travaux récents montrent que l'expression de l'ARFP dans des cellules dendritiques, dans des cellules Huh7 et dans des cellules dérivées de monocytes entraînaient la production de niveaux significatifs des cytokines: IL-6, IL-8, MCP-1 et MIP1 β connues pour leur implication dans la physiopathologie hépatique induite par le VHC alors que ces cytokines étaient absentes ou significativement réduites dans des mutants où l'ARFP ne pouvait être produite (Fiorucci et al., 2007). Du fait de la méconnaissance de sa fonction, l'ARFP n'est pas une cible des nouveaux antiviraux en développement. Une étude récente réalisée dans notre laboratoire montre que l'expression de la forme majeure de l'ARFP est réprimée par la protéine Core suggérant une corrélation inverse entre l'expression de cette protéine et la réplication du virus (Wolf et al., 2008).

I.4.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines du VHC sont clivées de la polyprotéine par une peptidase à peptide signal de la cellule hôte localisée dans le RE [(Op De Beeck et al., 2001) pour une revue]. (**Figure 5**).

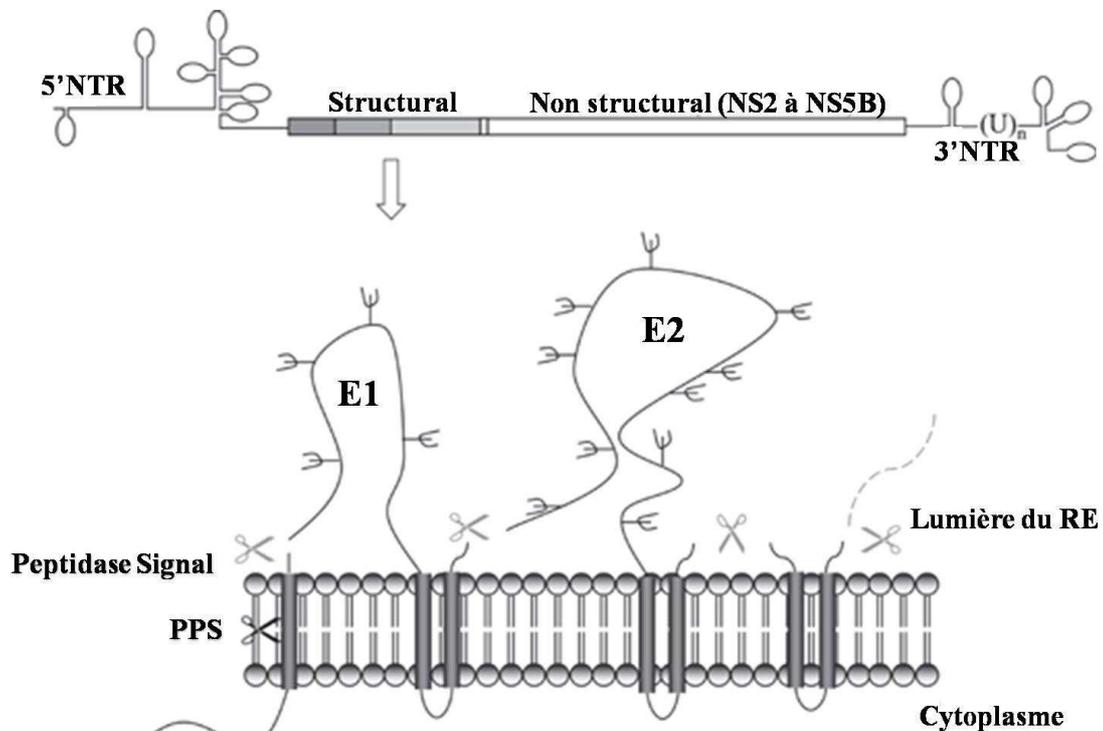


Figure 5: Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC avec leurs sites de glycosylation.

PPS Peptidase à peptide signal. Adapté de (Roingeard and Hourieux, 2008)

Ce sont des protéines transmembranaires possédant une grande partie externe N-terminale et une partie transmembranaire C-terminale. Elles s'assemblent en hétérodimères non covalents (Deleersnyder et al., 1997). Les domaines externes des protéines d'enveloppe du VHC sont modifiés par N-glycosylation. E1 et E2 possèdent respectivement jusqu'à 6 et 11 sites de glycosylation dont la plupart sont bien conservées (Goffard and Dubuisson, 2003; Zhang et al., 2004b). Il est intéressant de noter que certains de ces glycanes interviennent dans le repliement des glycoprotéines ou dans l'entrée du virus (Goffard et al., 2005). Du fait de leur importance dans l'entrée, les glycoprotéines du VHC sont une cible préférentielle des antiviraux en développement (Helle et al., 2006). Des régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence de E2 (Weiner et al., 1991). Les 27 premiers aminoacides de

l'ectodomaine de E2 forment la région hypervariable 1 (HVR1). La variabilité apparente de cette région semble résulter d'une sélection de variants d'échappement aux anticorps du système immunitaire. Un clone du VHC dépourvu de région hypervariable était encore infectieux mais fortement atténué chez le chimpanzé (Forns et al., 2000) supportant l'hypothèse d'un rôle fonctionnel de ce domaine, probablement dans l'entrée du virus (Bartosch et al., 2003b; Callens et al., 2005). Malgré la variabilité de séquence de HVR1, les propriétés physico-chimiques des résidus à chaque position et la conformation de HVR1 sont bien conservées dans les différents génotypes (Penin et al., 2001). De plus, HVR1 est une région globalement basique dont les résidus basiques interviennent dans la modulation de l'entrée du virus (Callens et al., 2005). Une autre région hypervariable HVR2, a été décrite dans E2 (Weiner et al., 1991) et participerait à la liaison par E2 de CD81 (Roccasecca et al., 2003).

L'hétérodimère E1E2 est principalement retenu dans le RE (Duvet et al., 1998; Rouille et al., 2006) même si on peut en détecter au niveau de la membrane plasmique en cas de surexpression (Bartosch et al., 2003a; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003). Les aminoacides intervenant dans cette rétention ont été cartographiés dans les domaines transmembranaires de E1 et E2 (Cocquerel et al., 1998; Cocquerel et al., 1999). Ces mêmes domaines transmembranaires en association avec des motifs répétés de résidus hydrophobes appelés motifs heptades proches de la membrane dans E2 seraient essentiels pour l'hétérodimérisation (Op De Beeck et al., 2000). E1 et E2 jouent un rôle majeur dans différentes étapes du cycle viral. Elles sont indispensables pour l'entrée du virus (Bartosch and Cosset, 2006; Cocquerel et al., 2006) et participent à l'assemblage des particules infectieuses (Wakita et al., 2005). L'hétérodimère E1E2 est le composant viral présent à la surface des particules du VHC et est donc le ligand candidat des récepteurs cellulaires. Une forme soluble de la glycoprotéine E2 a été utilisée dans les expériences initiales d'identification de potentiels récepteurs du VHC et a conduit à un groupe de récepteurs candidats: la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998), le récepteur humain de type scavenger de classe B et de type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002), l'héparane sulfate (Barth et al., 2003) et les lectines de liaison au mannose DC-SIGN et L-SIGN (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2003; Pohlmann et al., 2003). Une approche utilisant des particules de type viral produites dans des cellules d'insectes a permis l'identification du récepteur de l'asialoglycoprotéine comme un autre récepteur candidat du VHC (Saunier et al., 2003). Enfin, du fait de l'association du VHC avec les LDL et VLDL dans le sérum, le récepteur des LDL a été

proposé comme un autre récepteur candidat pour le VHC (Agnello et al., 1999; Monazahian et al., 1999). Toutefois, de toutes ces molécules, seules CD81 et SR-BI ont été confirmées comme intervenant dans l'entrée du virus (Cocquerel et al., 2006; Zeisel et al., 2007b; Barth et al., 2008). Néanmoins, la coexpression de CD81 et SR-BI dans des lignées cellulaires non hépatiques n'a pas conduit à l'entrée du virus indiquant que d'autres molécules exprimées spécifiquement dans les cellules hépatiques contribuent à l'entrée du VHC.

Les interactions entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et les récepteurs potentiels peuvent avoir des conséquences autres que l'effet direct sur l'entrée du virus. Par exemple, les récepteurs L-SIGN et DC-SIGN ne sont pas exprimés sur les hépatocytes mais les interactions du VHC avec ces molécules pourraient contribuer à l'établissement ou la persistance de l'infection à la fois par la capture et la libération du virus vers le foie mais aussi par la modulation des fonctions des cellules dendritiques comme récemment suggérées (Cormier et al., 2004a; Lozach et al., 2004). Il a aussi été montré que l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et CD81 peut conduire à la sécrétion d'exosomes contenant les glycoprotéines E1 et E2 (Masciopinto et al., 2004). Une forme soluble de E2 est aussi capable de lier CD81 à la surface des cellules Natural Killer (NK) avec inhibition de la cytotoxicité et de la production de cytokines par ces cellules (Crotta et al., 2002; Tseng and Klimpel, 2002). Cette liaison peut induire un signal costimulateur pour les cellules T (Wack et al., 2001; Rosa et al., 2005), activer les cellules B (Wack et al., 2001) et surréguler l'activité de la metalloproteinase-2 de matrice dans les cellules stellaires hépatiques humaines (Mazzocca et al., 2005). Il reste à déterminer si ces effets seront retrouvés dans le contexte de particules natives.

Du fait de leur exposition à la surface du virion, les protéines d'enveloppe sont la cible des anticorps neutralisants. Le développement récent de particules rétrovirales pseudotypées par des glycoprotéines E1 et E2 non modifiées du VHC (HCVpp) (Bartosch et al., 2003a; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003) a permis d'initier des études sur les anticorps neutralisants qui semblent indiquer que la majorité des patients ayant une infection chronique développe des anticorps neutralisants réagissant de façon croisée avec différents géotypes (Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005). A contrario, dans plusieurs cas de résolution spontanée de l'hépatite C aigue, ces anticorps neutralisants n'ont pas été retrouvés (Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005) et leur détection dans la phase aigue ne paraissait pas liée à une clairance virale (Logvinoff et al., 2004). Toutefois, une autre étude a montré chez certains patients l'émergence progressive d'une réponse neutralisante relativement forte corrélée à la

diminution de la virémie (Lavillette et al., 2005a). Plus récemment, Petska et coll. ont montré que l'induction rapide d'anticorps neutralisants durant la phase précoce de l'infection contribuait à son contrôle (Pestka et al., 2007). Des investigations futures avec le nouveau système de culture cellulaire du VHC sont nécessaires pour déterminer précisément le rôle des anticorps neutralisants dans le contrôle de l'infection. Il faut enfin préciser que la majorité des anticorps monoclonaux neutralisants anti-VHC reconnaissent E2 (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003; Keck et al., 2004; Owsianka et al., 2005; Schofield et al., 2005) notamment la région liant CD81 et la partie C-terminale de HVR1 (Hsu et al., 2003). Des études menées avec des anticorps neutralisants monoclonaux seront essentielles pour comprendre les mécanismes conduisant à la neutralisation du VHC.

I.4.4 p7

Dans la polyprotéine, le polypeptide p7 est localisé à la jonction entre protéines structurales et non-structurales (Lin et al., 1994a; Mizushima et al., 1994). Il est libéré suite au clivage par une peptidase à peptide signal cellulaire (Dubuisson et al., 2002). Le peptide p7 est une protéine membranaire polytopique composée de 2 domaines transmembranaires dont les extrémités N et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer et al., 2002). (Figure 6).

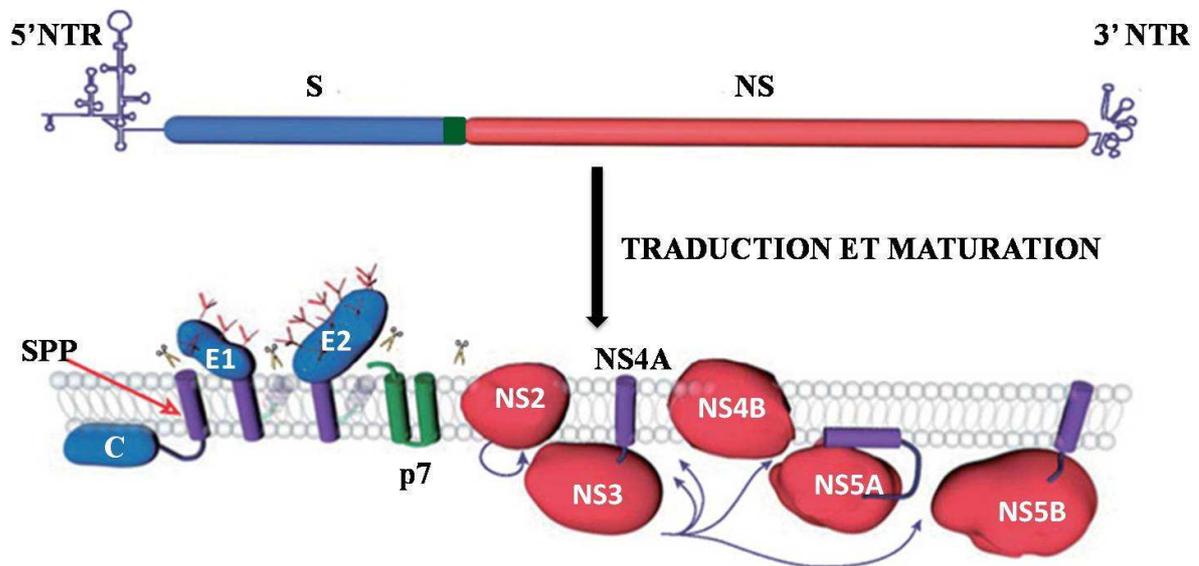


Figure 6: Organisation génomique et maturation de la polyprotéine

En bleu, les protéines structurales et la séquence nucléotidique qui les code. En vert, la protéine p7. En rouge, les protéines non structurales et la séquence codante nucléotidique. En violet, les domaines transmembranaires d'ancrage des différentes protéines. Les flèches et les ciseaux indiquent les sites de clivage. PPS peptidase à peptide signal. Adapté de (Dubuisson, 2007).

La partie C-terminale de p7 contient une séquence de réinitiation de translocation qui fusionnée à une protéine reporter fonctionne comme un peptide signal (Carrere-Kremer et al., 2002; Carrere-Kremer et al., 2004). Sa topologie transmembranaire avec un nombre limité de résidus accessibles de part et d'autre suggère qu'il participe à la structure de la membrane. Dans des systèmes d'expression hétérologue, p7 peut être trouvé associé aux membranes des mitochondries et du RE (Carrere-Kremer et al., 2002; Griffin et al., 2004; Griffin et al., 2005) voire en faible proportion dans la membrane plasmique (Carrere-Kremer et al., 2002). Il n'est pas requis pour la réplication de l'ARN et il n'est pas prouvé qu'il soit un composant du virion. Des études sur des membranes lipidiques artificielles lui ont attribué une activité de canal ionique (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003; Griffin et al., 2004; Premkumar et al., 2004) et il est de surcroît indispensable pour l'infectivité du VHC chez le chimpanzé (Sakai et al., 2003). Ces observations suggèrent que le criblage de petites molécules visant à bloquer l'activité canal ionique de p7 serait une approche intéressante pour développer de nouvelles molécules anti-VHC.

I.4.5 La protéine NS2

NS2 est intégralement une protéine membranaire qui n'est pas essentielle pour la formation du complexe de réplication (Lohmann et al., 1999; Blight et al., 2000). La fonction de NS2 dans sa forme mature est inconnue; toutefois avant d'être séparée de la polyprotéine, NS2 a une activité protéase responsable, en association avec les 180 premiers résidus de NS3, du clivage à la jonction NS2/NS3. L'enzyme NS2-3 a été décrite comme une cystéine-protéase (Pallaoro et al., 2001) dont la structure révèle un dimère avec 2 sites actifs comportant chacun une partie catalytique constituée de résidus histidine et glutamate et une partie nucléophile contenant une cystéine (Lorenz et al., 2006). La protéine chaperone Hsp90 serait requise pour l'activation de la protéase NS2-3 (Waxman et al., 2001). Le clivage de la partie N-terminale de NS2 de p7 est médiée par une peptidase à peptide signal dans le RE (Carrere-Kremer et al., 2002; Carrere-Kremer et al., 2004). Exprimée seule, NS2 est retrouvée associée à la membrane du RE (Franck et al., 2005) et du fait de sa richesse en aminoacides hydrophobes serait une protéine membranaire polytopique (Santolini et al., 1995; Yamaga and Ou, 2002). Sa topologie membranaire n'est pas clairement établie mais la présence de 2 séquence-signals internes suggère l'existence de quatre segments transmembranaires (Santolini et al., 1995; Yamaga and Ou, 2002). Toutefois, le clivage de la jonction NS2-3 se faisant dans le cytosol, la présence de l'extrémité C-terminale de NS2 dans la lumière du RE indique qu'il y a une réorientation de cette région après la séparation entre NS2 et NS3. Des sites de fusion pour

des chimères intergénomiques naturelles ou artificielles infectieuses du VHC ont été cartographiées dans NS2 (Kalinina et al., 2002; Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006). Ces données suggèrent qu'en plus de son implication dans le clivage à la jonction NS2-3, NS2 intervient dans l'assemblage et la libération du virus même si le mécanisme reste à déterminer. L'implication de NS2 dans l'activité protéase NS2-3 en fait une cible intéressante pour des molécules anti-VHC. Elle est par ailleurs la seule à interagir avec toutes les autres protéines non-structurales du VHC (Dimitrova et al., 2003).

Il a été montré que NS2 est une protéine éphémère dont la dégradation par le protéasome est dépendante de la protéine kinase CK2 (Franck et al., 2005). Elle interagirait aussi avec la protéine pro-apoptotique spécifique du foie CIDE-B et inhiberait l'apoptose induite par cette protéine (Erdtmann et al., 2003). Elle pourrait en outre altérer la transcription de gènes cellulaires et intervenir dans la carcinogénèse (Dumoulin et al., 2003) mais toutes ces propriétés n'ont pas encore été confirmées dans le système de culture cellulaire du VHC récemment mis au point (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005).

I.4.6 La protéine NS3

C'est une protéine hydrophile multifonctionnelle avec une partie N-terminale protéase à sérine et un domaine C-terminal portant une activité hélicase ARN-dépendante et une activité nucléoside triphosphate hydrolase (NTPase). Le domaine protéase est conformé comme un site actif de type chymotrypsine, avec deux feuilletts 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). L'activité protéase de NS3 est stimulée par le cofacteur NS4A (d'où son nom de protéase NS3/4A); la région d'activation de NS4A forme en effet un brin β qui s'intercale dans le feuillet β N-terminal de la protéase permettant son repliement adéquat (Kim et al., 1996). Il induit aussi un changement conformationnel qui conduit au repositionnement de la triade catalytique. NS3 n'a pas de domaine transmembranaire propre mais s'associe avec la partie centrale de NS4A; elle est retrouvée associée au RE quand elle est coexprimée avec NS4A alors qu'elle est diffuse dans le noyau et le cytoplasme quand elle est exprimée seule (Wolk et al., 2000). Des expériences de délétions ont révélé que c'est la partie hydrophobe N-terminale de NS4A qui permet le ciblage de NS3 vers le RE. NS4A stabilise aussi NS3 en le protégeant du clivage protéolytique. La protéase NS3-4A a une poche de liaison au substrat inhabituellement peu profonde et qui requiert donc de grandes surfaces d'interaction (Bartenschlager et al., 2004; Penin et al., 2004b); ce qui rend l'élaboration d'inhibiteurs de cette protéase particulièrement difficile (De Francesco and Migliaccio, 2005). Elle est

responsable du clivage de la polyprotéine dans la partie aval de NS3 (**Figure 6**) et cette activité est indispensable pour la génération des composants du complexe de réplication (Lindenbach and Rice, 2005); ce qui en a fait une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antivirales.

En plus de son rôle dans la maturation de la polyprotéine, l'activité protéase de NS3-4A participe au blocage de la réponse antivirale innée (Foy et al., 2003; Gale and Foy, 2005). (**Figure 7**).

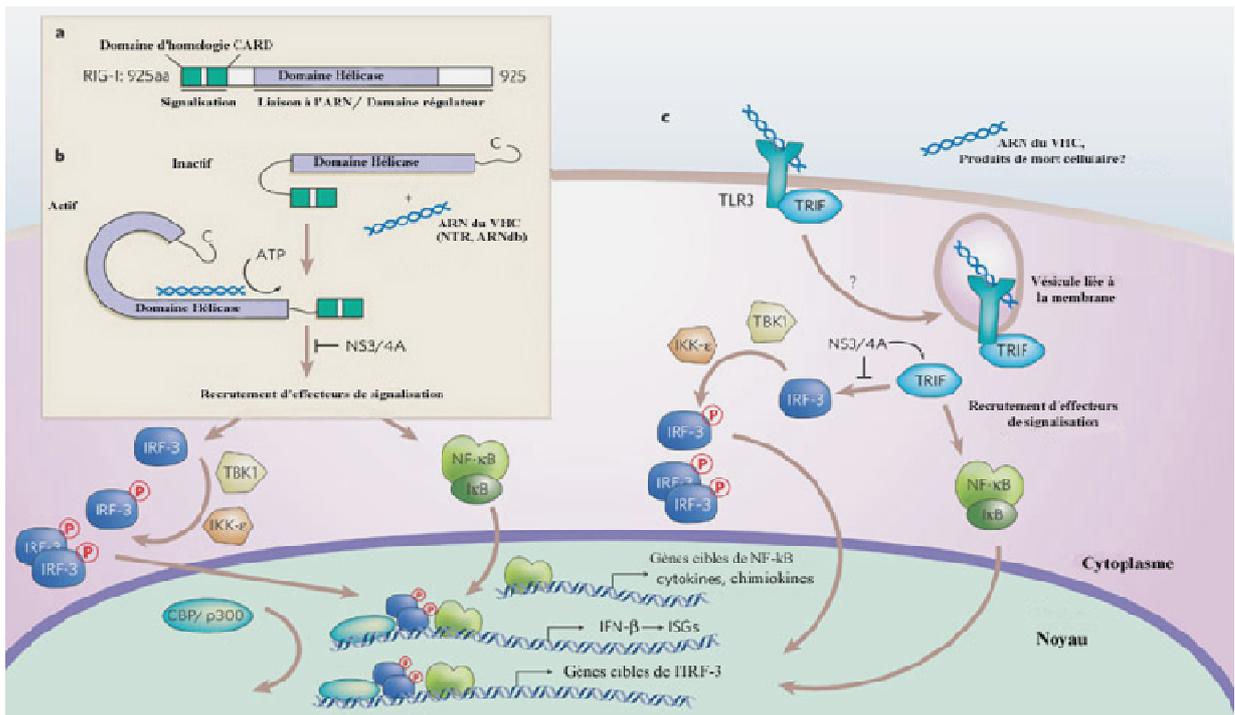


Figure 7: Déclenchement de l'activation d'IRF-3 par le VHC via RIG-I ou TLR-3 et contrôle de la signalisation par NS3/4A.

a. RIG-I comporte un tandem N-terminal d'activation et de recrutement de caspase (CARD) suivi d'un domaine ARN hélicase C-terminal. Les domaines CARD de RIG-I permettent l'activation de NF-κB et IRF-3. Le domaine hélicase de RIG-I lie les PAMP de l'ARN du VHC. b. La liaison des PAMP durant la réplication du VHC provoque une conformation ouverte qui permet la signalisation de CARD et entraîne le recrutement de facteurs de signalisation permettant la phosphorylation et l'activation de l'IRF-3. D'autres facteurs permettent la libération parallèle de NF-κB de son inhibiteur (IκB). CBP, CREB-binding protein. c. La signalisation déclenchée par les PAMP via le TLR3 requiert la protéine adaptatrice TRIF qui déclenche en aval la phosphorylation et l'activation de l'IRF-3 par les protéines kinases IKK-ε ou TBK1. TRIF permet aussi l'activation de NF-κB. La protéase NS3/4A bloque la signalisation des PAMP viraux en clivant ou en inactivant un ou plusieurs composants de la cascade RIG-I qui sont essentiels pour l'activation de IRF3 et NF-κB en aval. Adapté de (Gale and Foy, 2005). PAMP: Pathogens Associated Molecular Patterns

Elle interfère en effet avec les voies de signalisation des ARN bicaténaires. Elle perturbe la cascade du gène I inducible par l'acide rétinoïque (une hélicase ARN-dépendante) via la protéolyse d'une protéine adaptatrice nouvellement découverte et qui intervient dans l'activation du facteur 3 régulateur d'interféron (IRF-3) (Meylan et al., 2005). Du fait de sa découverte simultanée par quatre groupes différents, cette protéine adaptatrice est désignée par quatre noms différents: IPS-1, Cardif, VISA et MAVS (Sen and Sarkar, 2005). Le clivage par NS3-4A de MAVS/IPS-1/VISA/Cardif entraîne sa libération de la membrane mitochondriale et la perturbation de la cascade de signalisation immune antivirale (Li et al., 2005c). NS3-4A clive aussi la protéine adaptatrice TRIF (encore appelée TICAM-1) bloquant la voie de signalisation TLR-3 (Toll-like receptor 3) d'activation de l'IRF-3, qui est déclenchée par les ARNs double-brin extracellulaires (Li et al., 2005c). Cette deuxième voie a toutefois un rôle minimal dans le déclenchement de la réponse interféron antivirale (Lin et al., 2006). La partie C-terminale de NS3 code une hélicase ARN-dépendante DexH/D-box (Tai et al., 1996). Les enzymes de cette superfamille sont capables en présence d'ATP de séparer des duplexes ARN-ARN. La structure cristallographique de cette hélicase du VHC révèle une molécule en forme de Y composée de trois sous-domaines de tailles presque égales (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998). (**Figure 8**). Bien que le monomère de NS3 puisse se lier à l'ARN avec une forte affinité, le déroulement de l'ARN requiert un dimère de NS3 (Serebrov and Pyle, 2004). Les analyses cinétiques indiquent que l'enzyme réalise plusieurs cycles très coordonnés de déroulement rapide de l'ARN double-brin (Serebrov and Pyle, 2004; Levin et al., 2005). Plus récemment, il a été rapporté que le mouvement cyclique de l'hélicase NS3 est coordonné par l'ATP avec d'abord des étapes discrètes de 11 paires de bases puis le déroulement véritable se fait lors d'étapes plus rapides de 2 à 5 paires de bases (Dumont et al., 2006). L'activité hélicase de NS3 pourrait être modulée par des interactions entre les domaines sérine protéase et hélicase puisque la cinétique de déroulement de l'ARN est ralentie pour le domaine hélicase isolé par rapport à la protéine entière (Frick et al., 2004). La fonction de l'hélicase NS3 dans le cycle viral est inconnue mais elle pourrait intervenir dans la réplication de l'ARN en déroulant les tiges-boucles stables aux extrémités des brins (+) et (-) du génome viral. Elle pourrait aussi faire partie du complexe de réplication où elle modifierait les structures secondaires stables de l'ARN et/ou déplacerait les protéines liées interférant avec la synthèse d'ARN. Une étude récente montre une interaction entre NS3 et NS5B qui a pour effet de moduler l'activité hélicase de NS3 et confirme une implication de NS3 dans la réplication du génome viral (Jennings et al., 2008).

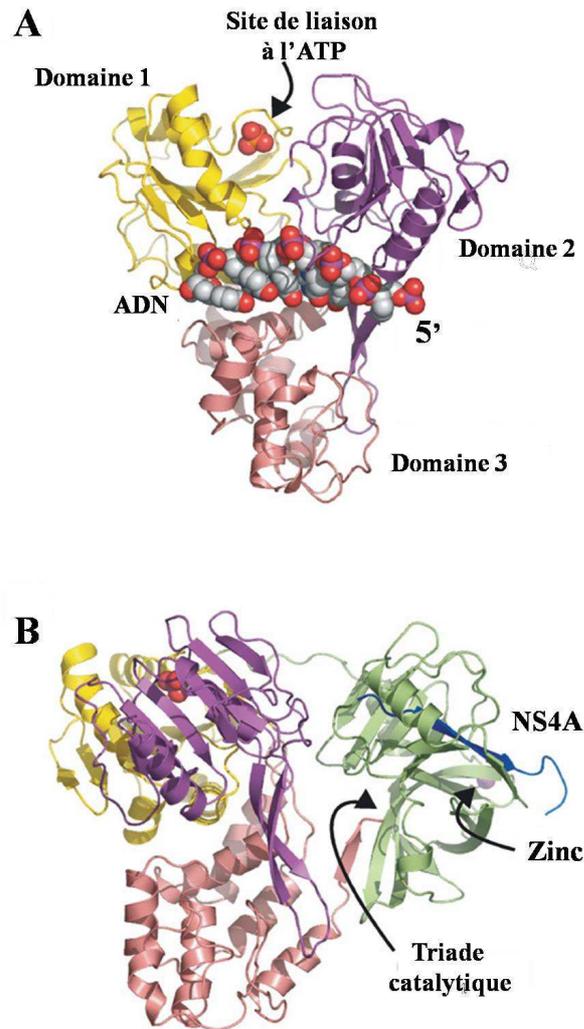


Figure 8: Structures de l'hélicase du VHC

A Structure de l'hélicase du VHC liée à un oligonucléotide d'ADN et à un ion sulfate. Le domaine N-terminal de type RecA (domaine 1) est coloré en jaune, le domaine C-terminal de type RecA (domaine 2) est coloré en pourpre et le domaine 3 en rose. L'ADN et l'ion sulfate (qui occupent le site de liaison à l'ATP) sont représentés par des sphères. **B** Le complexe NS3 entier avec la portion centrale de NS4A liée de façon covalente à l'extrémité N-terminale de NS3. Les domaines hélicase sont colorés comme en A, la protéase en vert et NS4A en bleu. La protéine a subi une rotation de 90° par rapport à A. Adapté de (Frick, 2007)

Elle pourrait en outre être requise pour la dissociation de la forme répliquative. Enfin, NS3 serait impliquée dans l'assemblage de particules infectieuses puisque des mutations dans les domaines 1 et 2 de l'hélicase restaurent la production de virions infectieux par une chimère intergénomique du VHC (Ma et al., 2008). Du fait de son activité enzymatique, le domaine hélicase de NS3 est une autre cible potentielle pour le développement de molécules d'anti-VHC. Il a été rapporté que NS3 interagissait avec de nombreuses protéines cellulaires

(Tellinghuisen and Rice, 2002) et qu'elle serait impliquée dans la carcinogénèse (Deng et al., 2006). Toutefois, la pertinence physiologique de ces interactions devra être confirmée dans le système de culture cellulaire du VHC nouvellement développé (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005).

I.4.7 La protéine NS4A

Avec ses 54 aa, NS4A est la plus petite protéine NS du VHC et joue des fonctions multiples dans le cycle viral. Sa partie hydrophobe intramembranaire N-terminale (résidus 1-20) permet l'ancrage du complexe NS3-4A au RE (Tanji et al., 1995; Wolk et al., 2000; Mottola et al., 2002; Nomura-Takigawa et al., 2006). La partie centrale (résidus 21-34) adjacente au segment intramembranaire permet l'interaction avec NS3 dont elle est le cofacteur (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1994; Lin et al., 1995). (**Figure 6**). NS4A augmente aussi l'activité de NS3 peut-être en interagissant avec les domaines sérine protéase et hélicase (Pang et al., 2002; Frick et al., 2004; Kuang et al., 2004). Une étude récente rapporte que la partie C-terminale restante (19 aa) adopterait une conformation en hélice α et agirait comme un régulateur dynamique de l'interaction NS3-4A, de l'hyperphosphorylation de NS5A et de l'activité de la réplicase virale (Lindenbach et al., 2007).

I.4.8 La protéine NS4B

NS4B est une protéine NS hautement hydrophobe possédant 4 domaines transmembranaires (Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003) dont la partie C-terminale subit une palmitoylation qui favorise la polymérisation protéique (Yu et al., 2006). Ses extrémités N et C-terminales sont localisées dans le cytosol mais une partie du domaine N-terminal peut être retrouvée dans la lumière du RE (Lundin et al., 2003). L'association aux membranes est médiée par une potentielle hélice amphipatique de la partie N-terminale (Elazar et al., 2004). NS4B est retrouvée associée aux membranes du RE (Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003; Gretton et al., 2005) et provoque des altérations membranaires intracellulaires suggérant qu'une de ses fonctions est d'induire la formation de structures membranaires dans lesquelles a lieu la réplication de l'ARN viral (Egger et al., 2002). Cependant, la structure des membranes induites par NS4B est légèrement différente du réseau membranaire observé quand toutes les protéines du VHC sont exprimées, ce qui fait penser à la contribution d'autres éléments notamment NS3/NS4A (Egger et al., 2002). Dans la partie centrale de NS4B, un motif de liaison aux nucléotides qui lie et hydrolyse le GTP a été décrit. La mutation ponctuelle de certains de ses aminoacides affecte la réplication de l'ARN génomique (Einav et al., 2004). Elle est aussi essentielle pour l'hyperphosphorylation de NS5A (Koch and Bartenschlager,

1999; Neddermann et al., 1999). Malgré l'intérêt de cette protéine pour la lutte antivirale du fait de sa capacité à induire le site de réplication du VHC, il demeure difficile de développer de petites molécules pour l'inhiber notamment du fait de son hydrophobicité qui rend difficile l'établissement de sa structure cristallographique.

I.4.9 La protéine NS5A

NS5A est une protéine associée à la membrane contenant une unique hélice α amphipathique à son extrémité N-terminale qui permet son ancrage à la membrane (Brass et al., 2002; Penin et al., 2004a) (**Figure 6**). Comme beaucoup de protéines du VHC, NS5A est détectée associée à la membrane du RE ou aux membranes dérivées (Brass et al., 2002). Elle possède en plus de cette hélice α , trois domaines distincts séparés par des séquences de moindre complexité I et II (Tellinghuisen et al., 2004). La structure cristallographique récemment établie du domaine I révèle qu'elle comporte un sous-domaine N-terminal IA basique et un sous-domaine C-terminal IB majoritairement acide (Tellinghuisen et al., 2005). Dans le sous-domaine IA, un ion zinc est coordonné par un motif unique de quatre résidus cystéine bien conservés dans les différents génotypes et qui sont indispensables pour la réplication de l'ARN (Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005). Dans le sous-domaine IB, près de l'extrémité C-terminale, un pont disulfure inhabituel liant deux résidus cystéine a été trouvé mais ne paraît pas essentiel pour la réplication virale. Le domaine I forme des homodimères par une interaction au voisinage des extrémités N-terminales formant un sillon basique localisé sur la membrane qui est un site d'ancrage de l'ARN dont elle régule le ciblage vers le complexe de réplication (Tellinghuisen et al., 2005). NS5A interagit en effet avec l'ARN viral avec une affinité particulière pour la partie riche en pyrimidines de l'extrémité non traduite du brin (+) (Huang et al., 2005). Le domaine I est de ce fait une cible de choix dans le développement de molécules antivirales. Les deux autres domaines sont moins caractérisés mais le domaine II est impliqué dans l'inhibition de la protéine kinase PKR qui est activée par l'interféron en présence d'ARN double-brin dans la cellule (Gale et al., 1998). Le domaine III est le moins conservé et peut tolérer l'insertion d'une molécule de GFP ou des délétions partielles (Moradpour et al., 2004b; Appel et al., 2005). Deux études récentes ont montré l'importance de la partie C-terminale pour l'assemblage des particules virales (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008).

NS5A est essentielle pour la réplication du génome; des mutations qui augmentent la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire ont été trouvées dans la région codant cette protéine (Seeger, 2005; Appel et al., 2006). De plus, l'interaction de NS5A avec NS5B est

indispensable au maintien des réplicons subgénomiques dans les cellules Huh-7 (Shirota et al., 2002; Shimakami et al., 2004). Elle est exprimée à la fois sous des formes hypo et hyperphosphorylées (Bartenschlager et al., 2004) dont on ne connaît pas la pertinence fonctionnelle même si les mutations limitant son hyperphosphorylation augmentent considérablement la réplication du génome viral (Evans et al., 2004; Appel et al., 2005). Toutefois, c'est son rôle potentiel dans la modulation de la réponse interféron qui a initialement suscité de l'intérêt (Tan and Katze, 2001). Elle interagit aussi avec des composants des cascades de signalisation cellulaires dont Grb2 (He et al., 2002), les tyrosines kinases de la famille Src (Macdonald et al., 2004; Macdonald and Harris, 2004), le récepteur I du TGF β (Choi and Hwang, 2006), MyD88 une molécule adaptatrice du TLR (Abe et al., 2007), l'EGFR (Mankouri et al., 2008) et modifie l'effet de ces voies de signalisation dans des cellules dérivées d'hépatomes humains transfectées par des réplicons subgénomiques du VHC. La protéine A humaine associée aux vésicules associées aux protéines membranaires (hVAP-A) qui est régulée par la phosphorylation de NS5A est un interactant cellulaire d'un intérêt particulier (Tu et al., 1999; Evans et al., 2004). En effet, l'hyperphosphorylation de NS5A bloque l'interaction avec hVAP-A et limite la réplication de l'ARN viral. VAP-A est trouvée dans les membranes du RE et de l'appareil de Golgi et intervient dans la mobilité intracellulaire des vésicules; mais il reste à déterminer pourquoi cette protéine est détournée par NS5A à certaines étapes du cycle viral. Un autre interactant cellulaire de NS5A qui est potentiellement important est la protéine FBL-2 géranylgeranylée dont l'inhibition par la technique de l'ARN interférent réduit considérablement la réplication de l'ARN viral (Wang et al., 2005). Dans une précédente étude, le même groupe montrait déjà que l'inhibition de la géranylgeranylation de protéines cellulaires bloquait la réplication de l'ARN viral (Ye et al., 2003).

I.4.10 La protéine NS5B

C'est l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC; elle constitue la composante catalytique de la machinerie de réplication de l'ARN. NS5B est une protéine associée à la membrane par son domaine transmembranaire C-terminal (Ivashkina et al., 2002) et qui est indispensable pour la réplication virale en culture cellulaire (Moradpour et al., 2004a) (**Figure 6**). Comme beaucoup de protéines du VHC, NS5B est associée à la membrane du RE ou aux membranes dérivées (Schmidt-Mende et al., 2001). NS5B peut initier une synthèse *de novo* de l'ARN *in vitro* et on pense que ce mécanisme est reproduit *in vivo* (Bartenschlager et al., 2004). La structure cristallographique du domaine catalytique de NS5B montre une conformation

structurale comparable aux autres polymérases qui s'articule en 3 sous-domaines «doigt», «paume» et «pouce» (Bressanelli et al., 1999; Lesburg et al., 1999). La paume contient le site actif de l'enzyme tandis que les «doigts» et le «pouce» modulent son interaction avec l'ARN. Une particularité structurale de cette enzyme est que son site actif est complètement enveloppé du fait d'interactions entre les «doigts» et le «pouce» créant un tunnel dans lequel la molécule d'ARN simple-brin est directement dirigée vers le site actif. Les NTPs entrent dans le site actif par un autre tunnel chargé positivement. On pense que la liaison de l'ARN matrice et l'initiation de la synthèse sont régulées par une tige-boucle β très flexible localisée dans le sous-domaine «pouce» et pointant vers le site actif (Appel et al., 2006). Comme d'autres polymérases virales, NS5B est une cible intéressante et prometteuse pour le développement de nouvelles molécules antivirales contre le VHC (De Francesco and Migliaccio, 2005).

L'activité ARN polymérase ARN-dépendante est modulée par des interactions avec les protéines virales NS3 et NS5A (Bartenschlager et al., 2004). La cyclophiline B, un peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase améliore l'affinité pour l'ARN de NS5B en interagissant avec sa partie C-terminale et stimule la réplication virale (Watashi et al., 2005) mais ce résultat obtenu avec un réplicon de génotype 1b n'a pas été retrouvé avec JFH1 (Ishii et al., 2006). La cyclosporine A, un inhibiteur des cyclophilines inhibe quant à elle la réplication du VHC en culture cellulaire (Watashi et al., 2003). NS5B interagit aussi avec d'autres protéines cellulaires: avec IKK α pour moduler la voie de signalisation du TNF α (Tumor necrosis factor α) ou avec le suppresseur de tumeur du retinoblastome (Rb) qu'elle oriente vers la dégradation, limitant sa quantité dans la cellule (Munakata et al., 2005; Choi et al., 2006).

I.5 METHODES D'ETUDE

I.5.1 Modèles animaux

I.5.1.1 Le chimpanzé

Pendant longtemps, le seul animal infectable par le VHC a été le chimpanzé (*Pan troglodytes*) (Alter et al., 1978; Hollinger et al., 1978). L'infection par le virus suit une progression identique à celle observée chez l'homme: présence d'ARN viral détectable dans le sang périphérique quelques jours après l'infection, hépatite aiguë caractérisée par une augmentation de l'activité sérique des transaminases 2 à 20 semaines après l'infection, développement d'une réponse immune adaptée, évolution vers la guérison ou, dans 50 à 70% des cas, vers la persistance de l'infection en dépit d'une réponse immune humorale et

cellulaire adaptée. De plus, comme chez l'homme l'infection chronique est associée à des lésions histologiques caractéristiques de l'hépatite chronique et à un risque d'hépatocarcinome (Bradley, 2000). Cependant, l'utilisation du modèle chimpanzé est limitée par ses différences avec l'infection humaine (moindre sévérité de la maladie hépatique, réponse immune atténuée), par des problèmes éthiques (homologie génétique de plus de 98,5%), par le coût très élevé de ces animaux et de leur entretien ainsi que par leur disponibilité, le chimpanzé étant une espèce protégée. D'importants efforts sont mis en œuvre pour développer des modèles de petits animaux de laboratoire et pour améliorer les systèmes cellulaires de propagation du virus.

I.5.1.2 Autres modèles

L'utilisation de virus proches du VHC a été une piste intéressante pour l'étude indirecte du cycle viral. Ainsi, l'infection du tamarin par le virus GB de type B (GBV-B) a suscité l'espoir d'une meilleure compréhension des étapes précoces de l'infection (Bukh et al., 1999). Ce virus hépatotrope, membre de la famille des Flaviviridae, présente 25 à 30% d'homologie de séquence aminoacide avec le VHC (Beames et al., 2000). Des études ont rapporté la transmission du VHC à la musaraigne (*tupaia belangeri*), espèce proche des primates et déjà connue pour supporter l'infection par certains virus tels que le VHB (Xie et al., 1998). Toutefois, les derniers travaux sur la souris et le rat font de ces deux rongeurs la piste la plus intéressante à l'heure actuelle. Il a en effet été possible d'infecter par le VHC des souris SCID-uPA et Trimera ou des rats greffés avec des hépatocytes humains, des lignées hépatocytaires voire des fragments de foie (Galun et al., 1995; Ilan et al., 2002; Meuleman et al., 2005; Wu et al., 2005; Eren et al., 2006). Ces différents modèles présentent les inestimables avantages d'être beaucoup moins chers, d'entretien plus facile et de se reproduire plus vite que les primates. Ce sont de bons outils pour une meilleure compréhension du virus et l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques. Il faut toutefois souligner qu'ils sont difficiles à mettre au point et que les caractéristiques acquises ne sont pas maintenues dans la descendance d'où la nécessité de pratiquer une greffe à chaque génération.

I.5.2 Les glycoprotéines solubles

En l'absence de systèmes modèles appropriés, des approches biochimiques d'analyse fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC ont été entreprises mais ont été limitées par leur tendance à l'aggrégation et au repliement incorrects du fait de leur forte rétention dans le RE et de la présence de séquences d'hétérodimérisation dans leurs domaines transmembranaires (Cocquerel et al., 2000). Pour pallier ces problèmes, plusieurs équipes ont

produit des formes solubles des glycoprotéines dont les domaines transmembranaires ont été délétés. Il a été montré que la glycoprotéine E2 soluble liait spécifiquement notamment des lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinome suggérant que l'attachement à la cellule est médié par l'ectodomaine de E2 (Michalak et al., 1997; Pileri et al., 1998; Flint et al., 1999a; Flint et al., 1999b; Higginbottom et al., 2000; Heo et al., 2004; Yamada et al., 2005). Elles ont été d'un grand apport dans l'étude des glycoprotéines natives malgré la mise en évidence de différences conformationnelles entre les deux formes solubles (Owsianka et al., 2001). Deux des récepteurs du VHC, CD81 et le SR-BI humain, ont été isolés par criblage avec la forme soluble de E2 (sE2) (Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002).

I.5.3 Les particules de type VHC (HCV-LPs)

En l'absence de virions du VHC, une approche précédemment expérimentée pour d'autres virus a été d'en déterminer la structure par l'intermédiaire de particules de type viral synthétisées *in vitro*. Ces dernières sont définies comme des particules s'assemblant seules, ne contenant pas de génome et incapables de se répliquer. Elles sont produites par la transformation de cellules de mammifères ou d'insectes par des vecteurs codant les protéines structurales Core, E1 et E2 du VHC. Il en résulte la formation dans les cellules transfectées de particules de type viral qui ne sont pas libérées dans le milieu extracellulaire, suggérant qu'une étape d'assemblage ou de sécrétion est bloquée dans ce système. Des particules de type viral purifiées à partir de lysats de cellules d'insecte présentaient des propriétés morphologiques et biophysiques semblables à celles des virions isolés de patients infectés par le VHC (Baumert et al., 1998; Baumert et al., 1999). Ces particules de type VHC ont été d'une grande utilité dans les études structurales et fonctionnelles de la protéine Core du VHC (Blanchard et al., 2002; Roingeard et al., 2004). Elles présentent par ailleurs des propriétés antigéniques semblables à celles du virus sauvage dans les tests de liaison ou de neutralisation de liaison; ce qui en fait des candidats vaccins potentiels (Baumert et al., 1999; Lechmann et al., 2001; Qiao et al., 2003; Steinmann et al., 2004; Barth et al., 2005). Toutefois, l'intérêt de cet outil se limite à l'étude des mécanismes d'attachement car l'absence de marqueur génomique dans ces particules le rend inapproprié pour l'exploration de l'entrée et de l'infection.

I.5.4 Les pseudoparticules du VHC (HCVpp)

Les particules pseudotypes sont produites par transfection de cellules de mammifères avec des vecteurs d'expression codant la polyprotéine E1E2 entière, des protéines de capsid (Core) rétroviral ou lentiviral et un génome rétro ou lentiviral portant un marqueur. Les cellules

transfectées sécrètent les virus assemblés dans le surnageant d'où ils peuvent être concentrés pour infecter des cellules naïves. (**Figure 9**).

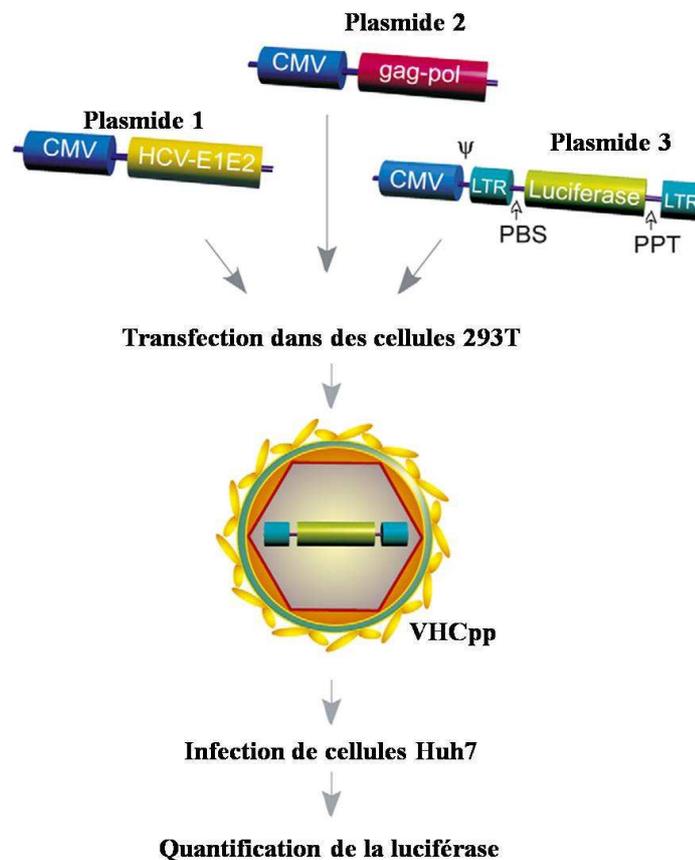


Figure 9: Production de pseudoparticules du VHC

LTR, Long Terminal Repeat; CMV, promoteur du cytomégalovirus; PBS, Primer Binding Site; ψ , séquence spécifique d'encapsidation rétrovirale; PPT, séquence poly-purine de polyadénylation. Adapté de (Voisset and Dubuisson, 2004)

L'infection des cellules cibles peut être contrôlée par la mesure de l'expression du marqueur intégré dans le génome viral. La production de VHCpp est relativement efficace avec une moyenne de 10^5 unités infectieuses par ml de surnageant (Bartosch et al., 2003a) et ne nécessite pas des conditions particulières de sécurité (sécurité biologique de niveau 2). Ces pseudoparticules permettent l'investigation de fonctions médiées par les glycoprotéines d'enveloppe du VHC et de nombreuses études ont montré qu'elles mimaient bien l'entrée et les propriétés sérologiques des virus natifs ou produits en culture cellulaire (Bartosch et al.,

2003a; Bartosch et al., 2003b; Bartosch and Cosset, 2004; Zhang et al., 2004a; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Leur limite est de ne pas permettre l'étude du cycle viral complet.

I.5.5 Les réplicons subgénomiques du VHC

Ce sont des constructions exprimant le complexe réplicase viral et doué de réplication autonome sous pression de sélection antibiotique. Les auteurs ont construit des vecteurs bicistroniques comportant: (i) en 5' l'IRES du VHC qui assure la traduction d'un gène de résistance antibiotique (*neo*), (ii) l'IRES du VEMC (Virus de l'EncéphaloMyoCardite) assurant la traduction du complexe réplicase (comportant au moins les protéines NS3 à NS5B) et (iii) en 3' la partie 3'NTR du VHC qui termine la construction. Seuls les clones résistants à la néomycine répliquent l'ARN du VHC (Lohmann et al., 1999). (**Figure 10**).

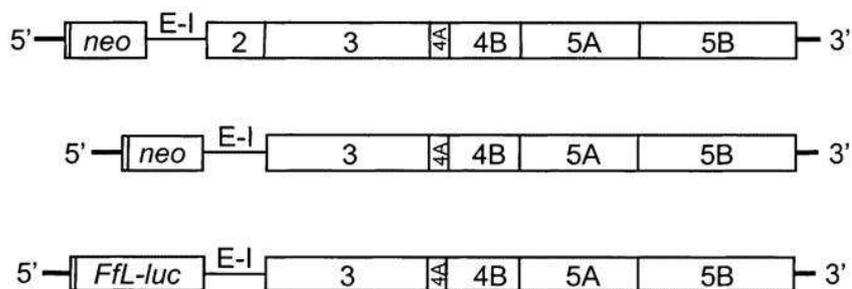


Figure 10: Structure des réplicons subgénomiques du VHC

De gauche à droite l'extrémité 5'NTR, le gène codant la néomycine phosphotransférase (*neo*) ou la luciférase (*FfL-luc*), l'IRES de l'ECMV (*EI*), la région codant les protéines NS2 à NS5B ou NS3 à NS5B du VHC et l'extrémité 3'NTR. Pour une plus forte activité de l'IRES du VHC, les codons 12-16 N-terminaux de l'ORF de Core furent inclus entraînant l'expression de la protéine de fusion Core-Néomycine phosphotransférase. (Bartenschlager and Lohmann, 2001)

Cette approche a permis la sélection de lignées cellulaires telles que Huh7.5 et Huh7-Lunet répliquant fortement le virus (Blight et al., 2002; Friebe et al., 2005). La culture cellulaire conduit à l'apparition de mutations adaptatives dans le virus, principalement dans les régions NS3, NS4B et NS5A (Bartenschlager et al., 2004). Plusieurs de ces mutations modifient l'état de phosphorylation de NS5A dont la forme hyperphosphorylée est délétère pour la réplication efficace de VHC (Evans et al., 2004; Neddermann et al., 2004). Ce système a été d'un grand apport pour l'étude de la réplication du VHC et pour tester des drogues antivirales ciblant des enzymes du VHC. Néanmoins, les réplicons génomiques qui utilisent une séquence consensus du génome entier n'ont pas permis la production de particules infectieuses (Pietschmann et al., 2002). On pense que les différents marqueurs qui permettent la sélection des formes

réplicatives perturbent la sécrétion de particules virales. Par ailleurs, la pression de sélection qui se fait sur les protéines non structurales générant des mutations qui optimisent la réplication du virus, est délétère pour la production de particules virales (Bukh et al., 2002). Il a toutefois récemment été décrit un réplicon génomique du VHC de génotype 2a qui se réplique efficacement dans des cellules dérivées de la lignée Huh7 sans pression de sélection antibiotique. Cette découverte constitue une avancée majeure dans la recherche sur le VHC avec pour la première fois la mise au point d'un système efficace de culture cellulaire du virus et la production de particules infectieuses en laboratoire.

I.5.6 Culture cellulaire du VHC

L'année 2005 aura été déterminante pour la mise au point d'un système de culture cellulaire efficace permettant de reproduire un cycle infectieux complet du VHC *ex vivo*. Plusieurs études ont montré qu'un réplicon génomique de génotype 2a du VHC, nommé JFH1 (Japanese Fulminant Hepatitis) parce qu'isolé d'un patient japonais présentant une hépatite fulminante (Kato et al., 2001), était capable de se répliquer efficacement sans mutations adaptatives et de produire des particules virales infectieuses en culture cellulaire et chez le chimpanzé (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ce système, basé sur la transfection de l'ARNm de JFH1 dans des cellules dérivées de la lignée Huh7 et sélectionnées pour leur permissivité à la réplication du VHC a été une étape majeure dans la recherche sur le VHC. Il permet désormais l'étude du cycle viral entier *ex vivo*. (**Figure 11**). Les premiers résultats obtenus avec ces particules du VHC produites en culture cellulaire (VHCcc) ont largement confirmé les données acquises précédemment avec d'autres outils d'étude sur l'entrée du VHC, permettant l'émergence d'un modèle général. Ainsi, il est admis que les deux glycoprotéines sont requises pour l'entrée (Wakita et al., 2005) et que les lignées cellulaires hépatiques sont les plus permissives à l'entrée du VHC. Il a aussi permis un consensus sur l'activité des anticorps neutralisants (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005; Haberstroh et al., 2008; Zeisel et al., 2008). Toutefois, si le VHCcc apparaît clairement comme le système préférentiel pour les investigations futures sur la biologie du VHC, il a aussi ses limites en termes de sécurité et de sa restriction à un seul génotype.

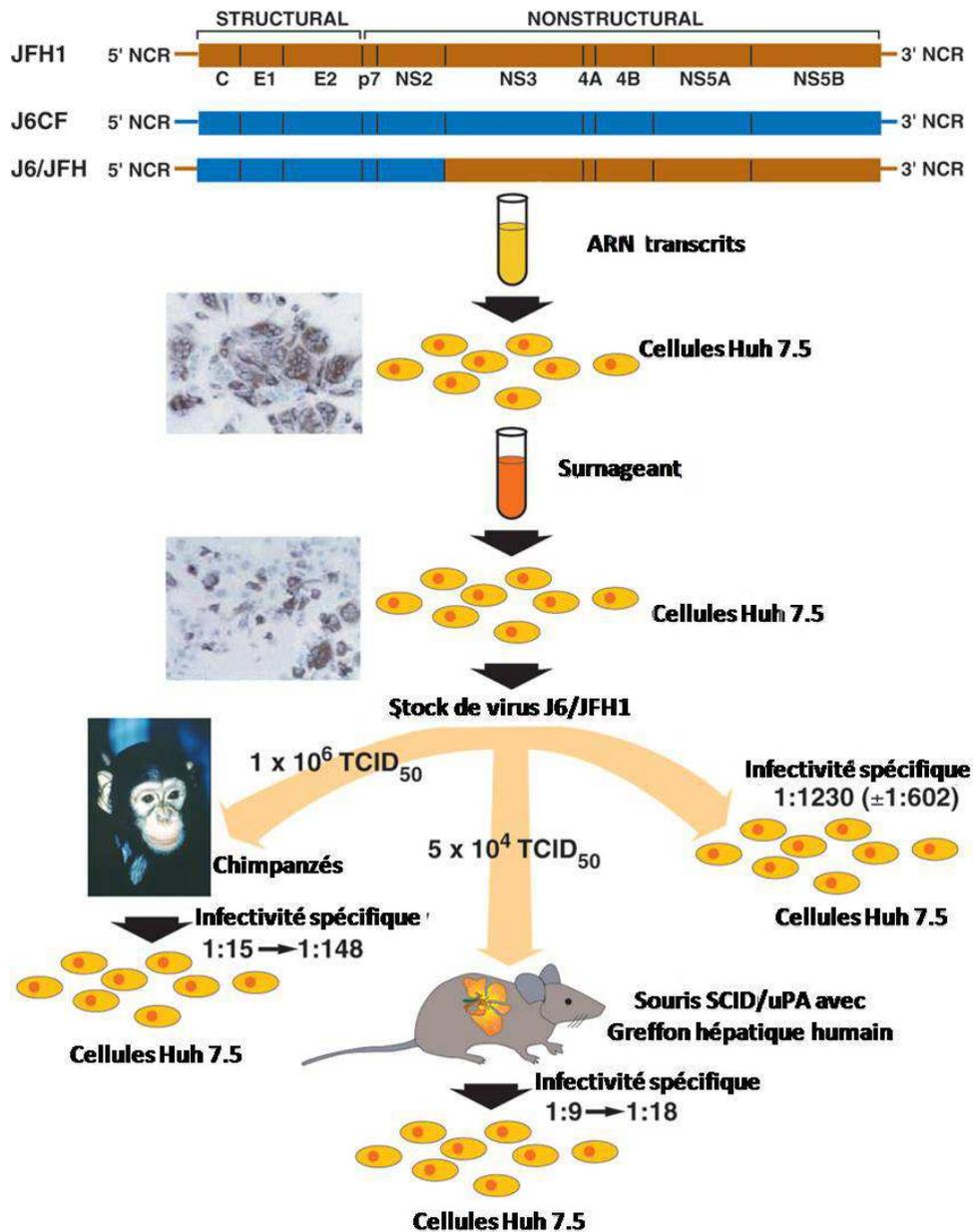


Figure 11: Génération de virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectivité *in vivo*.

Les ARN transcrits à partir du génome J6/JFH1 ont été transfectés dans des cellules Huh7.5 et les surnageants filtrés ont servi à infecter des cellules Huh7.5 naïves. Du virus titré à partir du stock a été inoculé à deux chimpanzés en Intraveineuse et à deux souris SCID-uPA avec un greffon hépatique humain en Intrapéritonéale. Il en a résulté une infection productive. L'infectivité spécifique (ratio du titre infectieux sur le titre d'ARN) a été déterminée sur des cellules Huh-7 naïves à partir des sera de chimpanzé et de souris. TCID₅₀: Dose de culture tissulaire infectieuse pour 50% des cellules en culture.

J6/JFH1 est un virus chimérique intragénotypique résultant de la fusion des réplicons J6 et JFH1 tous deux de génotype 2a.

Adapté de (Bukh and Purcell, 2006).

I.6 LE CYCLE VIRAL

Malgré des avancées encourageantes avec le système VHCcc, le cycle viral du VHC n'est pas encore entièrement élucidé et fait l'objet d'intenses investigations. Il peut être résumé en 5 étapes: l'attachement de la particule virale à la membrane de la cellule hôte suivie de son internalisation, la traduction de la polyprotéine, la réplication de l'ARN viral puis l'assemblage et le relargage des virions. (**Figure 12**).

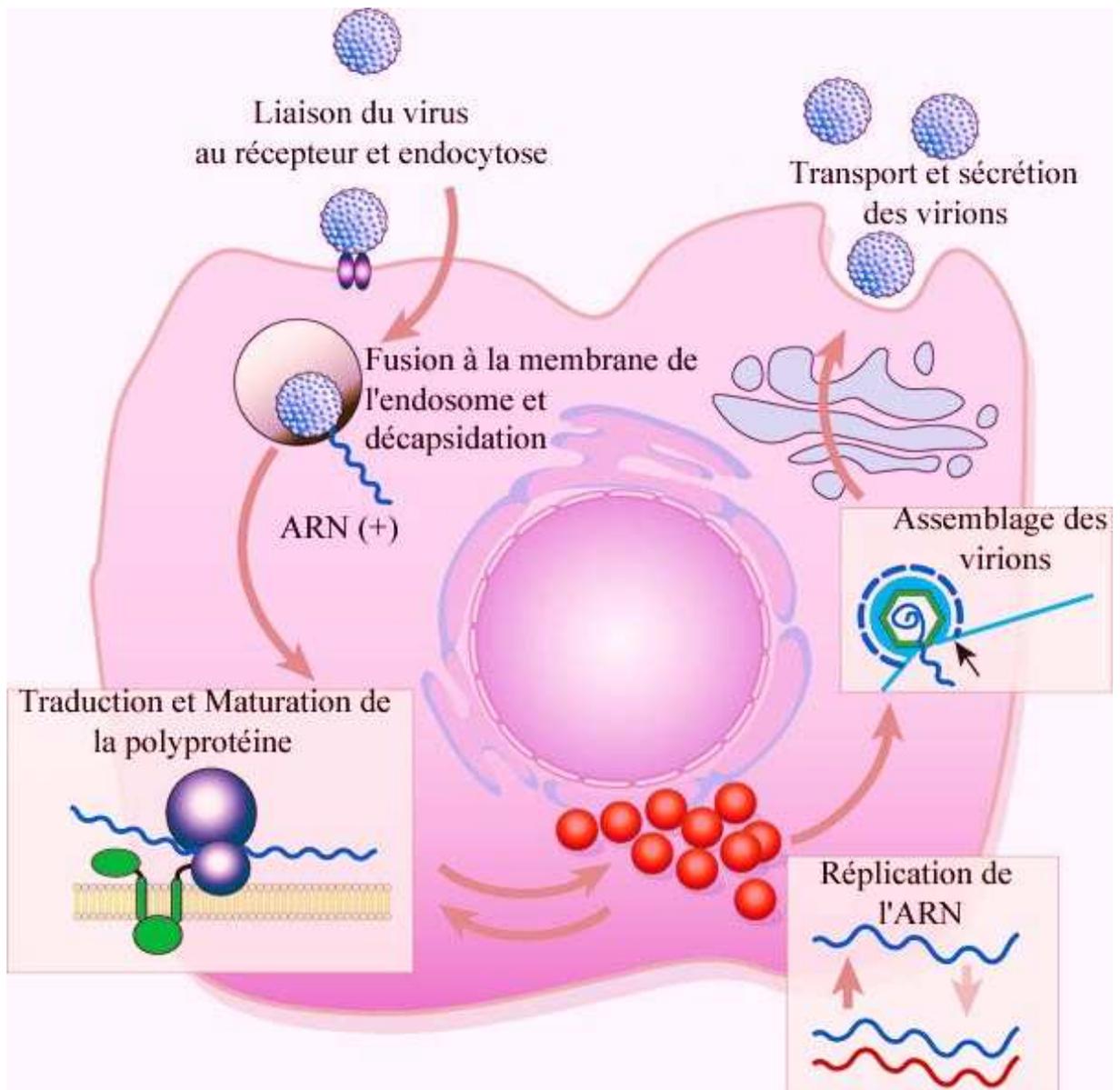


Figure 12: Le cycle viral du VHC.

Une fois entré dans la cellule et décapsidé, le génome du VHC est traduit en une polyprotéine, répliqué et intégré aux virions naissants qui sont ensuite exportés. Adapté de (Lindenbach and Rice, 2005).

I.6.1 Attachement de la particule virale

L'entrée du virus est initiée par la liaison de la particule à des facteurs d'attachement qui permettent la concentration des virus à la surface de la cellule hôte. Certains de ces facteurs d'attachement sont spécifiques tandis que d'autres le sont moins.

I.6.1.1 Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) présents à la surface des cellules sont des sites de liaison de plusieurs virus dont les Flaviviridae (Chen et al., 1997; Mandl et al., 2001; Germi et al., 2002b). Il en existe plusieurs types: les chondroitines sulfates, les dermatanes sulfates, les héparanes sulfates, l'héparine et l'hyaluronane. Au moyen de différents systèmes modèles (E2s, VHC_{pp}, VHC_{cc}, virus isolés de patients), plusieurs équipes ont montré que l'héparine, un homologue de l'héparane sulfate et l'héparinase, une enzyme capable de dégrader les héparanes sulfates présentes à la surface de la cellule inhibaient l'attachement à des cellules cibles (Germi et al., 2002a; Barth et al., 2003; Barth et al., 2006; Morikawa et al., 2007). Une forme intracellulaire de E2 soluble (sE2) a une forte affinité pour l'héparine via son domaine HVR1 (Barth et al., 2003). On n'a cependant pas observé d'interactions de E2 avec l'héparine dans le cas des hétérodimères E1E2 isolé des VHC_{pp} (Callens et al., 2005) suggérant que le domaine de liaison de E2 à l'héparine n'était pas accessible dans l'hétérodimère fonctionnel.

Pour une meilleure compréhension du rôle des GAGs dans l'entrée du VHC, de nouvelles études devraient être réalisées avec des glycoprotéines d'enveloppe isolées dans le contexte des VHC_{cc}. Des motifs de liaison à l'héparine ont été identifiés dans E2 *in vitro* (Olenina et al., 2005). Il est donc possible que ce motif ne se forme qu'à la surface de la protéine repliée. On ne peut pas non plus exclure la possibilité que le VHC interagisse indirectement avec les GAGs au travers de lipoprotéines associées aux particules virales; il a en effet été suggéré que la lipoprotéine lipase intervient indirectement dans les interactions entre le VHC et les GAGs sans toutefois provoquer d'infection productive (Andreo et al., 2007).

I.6.1.2 Le récepteur des LDL

La densité des particules du VHC dans le sang des patients infectés est très hétérogène. On l'a attribué à l'association du VHC avec des lipoprotéines LDL et VLDL même si le détail de l'interaction VHC-lipoprotéine reste méconnu (Thomssen et al., 1992; Andre et al., 2002; Nielsen et al., 2006). Du fait de l'interaction potentielle entre le VHC et les lipoprotéines, le récepteur des LDL a été proposé comme un éventuel facteur d'entrée du VHC (Agnello et al., 1999; Monazahian et al., 1999; Wunschmann et al., 2000). L'adsorption à la surface de la

cellule des particules virales isolées de patients et l'accumulation de l'ARN viral dans les cellules peuvent être inhibées par des anticorps dirigés contre les récepteurs des HDL, des LDL et VLDL purifiés (Agnello et al., 1999; Germei et al., 2002a; Molina et al., 2007). De plus, une corrélation a été montrée entre l'accumulation d'ARN du VHC dans les hépatocytes primaires, l'expression d'ARNm du récepteur des LDL et l'entrée des LDL (Molina et al., 2007). L'inhibition de l'entrée du VHCcc par des anticorps anti-apolipoprotéine B est un autre argument en faveur du rôle du récepteur des LDL dans l'entrée du VHC (Andreo et al., 2007). Il n'y a cependant aucune évidence de l'utilisation de ce récepteur par les VHCpp pour entrer dans les hépatocytes (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que contrairement au VHCcc (Huang et al., 2007), les VHCpp s'assemblent indépendamment des VLDL (Sandrin et al., 2005).

I.6.1.3 CD81

L'utilisation de formes solubles de E2 (sE2) a permis d'identifier CD81 comme un facteur d'entrée du VHC (Pileri et al., 1998). CD81 appartient à la famille des tétraspanines dont les membres sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la morphologie, la prolifération ou la différenciation (Levy and Shoham, 2005). Comme les autres membres de la famille des tétraspanines, CD81 est composé de quatre domaines transmembranaires, d'une grande et d'une petite boucle extracellulaires (Seigneuret, 2006). **(Figure 13)**. Depuis son identification comme une molécule interagissant avec sE2, l'implication de CD81 dans l'entrée du VHC a largement été confirmée dans différents modèles. Ainsi, des anticorps monoclonaux anti-CD81 ainsi qu'une forme soluble de son grand domaine extracellulaire inhibent l'infectivité des VHCpp et VHCcc (Bartosch et al., 2003a; Zhang et al., 2004a; Wakita et al., 2005; Kapadia et al., 2007). De plus, l'extinction sélective de CD81 dans des lignées hépatiques immortalisées empêche leur infectivité par les VHCcc et VHCpp (Zhang et al., 2004a; Akazawa et al., 2007). Enfin, les lignées hépatiques HepG2 et HH29 qui n'expriment pas constitutivement CD81, deviennent permissives aux VHCcc et VHCpp après l'expression ectopique de ce récepteur (Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005b; Lindenbach et al., 2005). D'autres études montrent aussi que la susceptibilité à l'infection par le VHC est étroitement liée au niveau d'expression de CD81 (Akazawa et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2007). Les résidus de CD81 impliqués dans l'interaction avec E2 ont été localisés dans le grand domaine extracellulaire (Pileri et al., 1998) et ce sont les résidus 420, 437, 438, 441, 442, 527, 529, 530 et 535 qui interviennent dans l'interaction (Drummer et al., 2006; Owsianka et al., 2006). L'hétérodimère E1E2 a une plus forte

interaction avec CD81 que sE2 suggérant que E1 module la liaison de E2 à CD81 (Cocquerel et al., 2003).

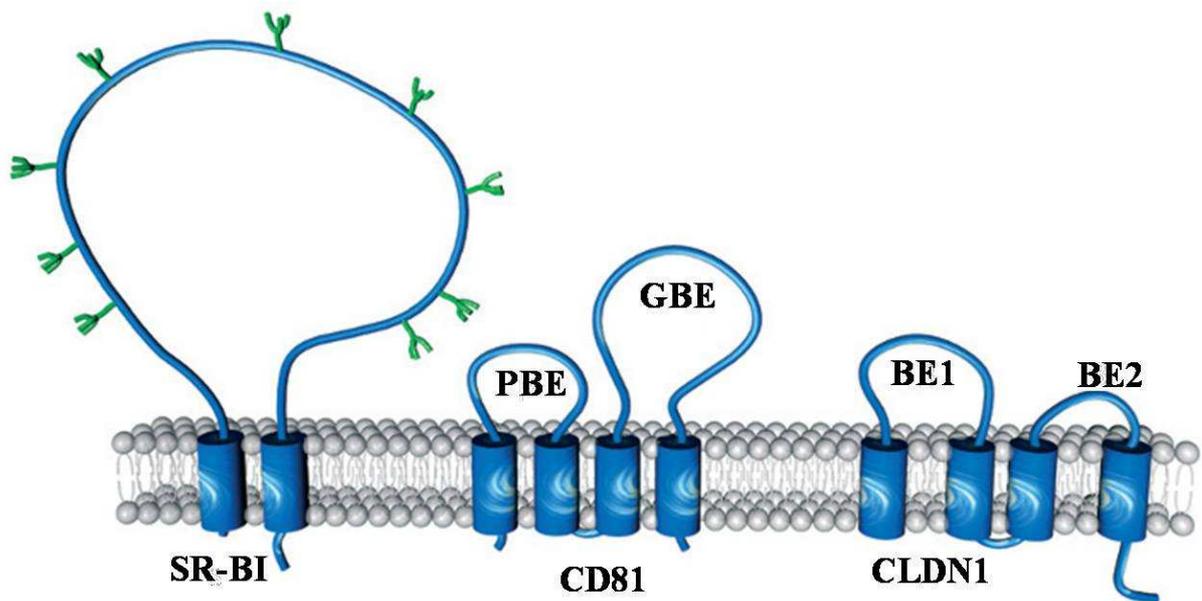


Figure 13: Représentation schématique de SR-BI, CD81 et CLDN1

SR-BI est composé de deux passages transmembranaires, deux domaines intracellulaires [de 11 et 45 aminoacides (aa)] et une grande boucle extracellulaire (411 aa). Il comporte neuf sites potentiels de glycosylation représentés en vert. CD81 est composé de quatre domaines transmembranaires, deux domaines intracellulaires (de 12 aa chacun), une petite boucle intracellulaire (5 aa) et deux boucles extracellulaires, PBE (30 aa) et GBE (89 aa). CLDN1 est composé de quatre passages transmembranaires, un court peptide intracellulaire N-terminal (7 aa), une boucle intracellulaire (13 aa), une queue intracellulaire C-terminale (27 aa) et deux boucles extracellulaires, BE1 (53 aa) et BE2 (27 aa). Adapté de (Helle and Dubuisson, 2008)

Plusieurs études ont montré que CD81 agit après la liaison du virus mais son rôle exact dans l'entrée du VHC reste à déterminer (Koutsoudakis et al., 2006; Evans et al., 2007). Le tropisme du VHC est restreint aux cellules hépatiques exprimant CD81 (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003; Zhang et al., 2004a) mais l'expression ectopique de ce récepteur sur des cellules non hépatiques ne les rend pas pour autant permissives au VHC (Bartosch et al., 2003b; Hsu et al., 2003), ce qui fait penser que cette entrée requiert l'intervention de facteurs additionnels. Une étude récente montre que l'expression ectopique de EWI-2wint (EWI-2 without its N-terminus) dans des cellules permissives inhibe leur infection par les VHCpps et VHCccs du fait de l'interférence de cette protéine dans l'interaction E2-CD81 (Rocha-Perugini et al., 2008). EWI-2wint qui est un produit de clivage de EWI-2, un interactant connu de CD81, n'est pas exprimé dans les hépatocytes et pourrait déterminer

l'hépatotropisme du VHC. Des investigations supplémentaires sont à mener pour vérifier cette hypothèse et déterminer le rôle précis de cette protéine.

I.6.1.4 SRBI

Le SRBI (Scavenger Receptor class B type I) humain aussi appelé CLA-1 est une protéine cellulaire de surface qui a été identifiée comme un autre facteur d'entrée du VHC (Scarselli et al., 2002). SRBI est une protéine de 509 aminoacides contenant deux courts domaines cytoplasmiques, deux domaines transmembranaires et une grande boucle extracellulaire (Calvo and Vega, 1993; Rhainds and Brissette, 2004). (**Figure 13**). Même si son interaction avec sE2 paraît spécifique (Scarselli et al., 2002), aucune interaction avec les hétérodimères E1E2 n'a encore été observée (Cocquerel et al., 2006). Néanmoins, l'implication de SRBI dans l'entrée du virus a largement été confirmée tant par les VHCpp que par les VHCcc (Bartosch et al., 2003b; Kapadia et al., 2007; Zeisel et al., 2007b). Ainsi, il a été montré que la pré-incubation de cellules Huh-7 avec des anticorps anti-SRBI diminuait significativement l'entrée du VHC (Bartosch et al., 2003b; Catanese et al., 2007; Kapadia et al., 2007). De plus, l'extinction génétique ciblée de SRBI par la technique de l'ARN interférent dans des lignées cellulaires hépatiques les rendait moins permissives aux VHCpp et aux VHCcc (Lavillette et al., 2005a; Zeisel et al., 2007b). SRBI est exprimé dans la majorité des cellules de mammifères mais son expression est particulièrement importante dans le foie (Acton et al., 1996; Cao et al., 1997; Bartosch et al., 2003b). Le gène codant permet l'expression de plusieurs isoformes du fait d'un épissage alternatif et l'isoforme SRBII qui diffère de SRBI par son extrémité C-terminale est aussi impliquée dans l'entrée du VHC car sa surexpression augmente l'infectivité du VHC (Grove et al., 2007).

SRBI est un récepteur des LDL oxydés et acétylés mais aussi des HDL (Acton et al., 1994; Acton et al., 1996). Alors que les LDL oxydés inhibent l'infectivité des VHCpp et VHCcc (von Hahn et al., 2006), les HDL en facilitent l'entrée et cette caractéristique est due à la propriété de transfert de lipides de SRBI (Voisset et al., 2005; Dreux et al., 2006). Plusieurs études suggèrent que la région HVR1 de E2 est indispensable pour l'interaction entre SRBI et le VHC (Scarselli et al., 2002; Bartosch et al., 2003a).

Le rôle exact de SRBI dans l'entrée du VHC n'est pas encore entièrement élucidé. Des données récentes proposent une interaction directe entre la particule virale et SRBI (Catanese et al., 2007; Evans et al., 2007) mais il a aussi précédemment été proposé que SRBI pourrait interagir avec le virus par ses lipoprotéines associées (Maillard et al., 2006). Les cinétiques

d'inhibition avec des anticorps anti-SRBI suggèrent que SRBI pourrait agir de façon concomitante à CD81, mais après une interaction préalable de la particule virale avec CD81 (Zeisel et al., 2007b). Enfin, SRBI est capable de modifier la composition lipidique de la membrane plasmique (Reaven et al., 2000; Huang et al., 2003; Peng et al., 2004) et la stimulation de la pénétration du virus pourrait être un effet induit de cette propriété, comme le suggère l'accélération de l'endocytose des VHCpp par les HDL (Dreux et al., 2006).

I.6.1.5 Les récepteurs de la famille Claudine

C'est le récepteur le plus récemment découvert. Le criblage d'une banque d'ADNc dérivée de cellules permissives au VHC pour la recherche de gènes qui rendraient susceptibles à l'infection par les VHCpp a permis d'identifier une nouvelle protéine comme un corécepteur pour l'entrée du VHC: Claudine-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007). Cette protéine majoritairement exprimée dans le foie appartient à la famille des Claudines. Ces protéines sont essentielles à la formation des jonctions intercellulaires étanches (Morita et al., 1999) responsables du contrôle du transport paracellulaire et du maintien de la polarité cellulaire (Gumbiner, 1993). A ce jour, 20 membres de cette famille ont été identifiés chez les humains selon UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>). Plusieurs tissus expriment diverses protéines claudines qui s'associent entre elles de façon homologue ou hétérologue pour former les jonctions étanches (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Ces protéines (20 à 27 kDa) contiennent deux boucles extracellulaires, trois domaines intracellulaires; quatre passages transmembranaires (**Figure 13**) et sont caractérisées par la présence d'un motif W-GLWC-C très conservé dans la première boucle extracellulaire (EL1). L'expression de CLDN1 dans des cellules non-hépatiques 293T les rend permissives à l'infection par les VHCpp et VHCcc. Ces cellules exprimant naturellement CD81 et SR-BI (Bartosch et al., 2003b), CLDN1 est la première protéine décrite qui confère une susceptibilité à l'infection par le VHC à des cellules non-hépatiques. L'extinction génétique ciblée de CLDN1 dans des cellules permissives au VHC réduit la permissivité au VHC alors que dans le même temps la surexpression de CLDN1 n'augmente pas leur infectabilité. La région de CLDN1 impliquée dans l'entrée du VHC correspond à la première boucle extracellulaire et particulièrement aux résidus I32 et E48. Un anticorps dirigé contre un épitope de EL1 inhibe l'infectivité du VHC de façon dose-dépendante; par ailleurs les cinétiques d'inhibition d'entrée des VHCpp dans des cellules cibles par des anticorps spécifiques suggèrent que CLDN1 intervient dans la phase tardive du processus d'entrée probablement après la liaison du virus et l'interaction avec CD81 (Evans et al., 2007). A ce jour, il n'a pas été rapporté

d'interaction directe de CLDN1 avec la particule virale mais on ne peut exclure que cette interaction requiert un changement conformationnel préalable dans les glycoprotéines d'enveloppe qui ferait suite à l'interaction entre E2 et un facteur d'entrée tel que CD81 et SRBI. En accord avec cette idée, la colocalisation de CD81 et CLDN1 dans le tissu hépatique et plus récemment une interaction indirecte par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre des anticorps spécifiques de CD81 et CLDN1 dans du tissu hépatique humain ont été rapportées (Harris et al., 2008). La même étude rapporte que le traitement de cellules Huh-7.5 préalablement infectées par du VHC avec des glycoprotéines E1E2 recombinantes et des anticorps monoclonaux anti-CD81 module l'association homotypique (CD81-CD81) et hétérotypique (CD81-CLDN1) de ces corécepteurs du VHC à des sites cellulaires spécifiques, suggérant des rôles distincts dans l'entrée du VHC. Ainsi, le rôle précis de CLDN1 dans l'entrée du VHC reste à déterminer mais sa localisation dans les jonctions intercellulaires étanches des hépatocytes polarisés permet raisonnablement de croire qu'elle n'intervient qu'après la migration latérale du complexe virus-récepteur au niveau de ces jonctions.

Deux équipes ont rapporté l'implication des protéines CLDN6 et 9 comme corécepteurs additionnels du VHC (Zheng et al., 2007; Meertens et al., 2008). Elles montrent que CLDN1, 6 et 9 ont une même efficacité dans l'entrée du VHC dans des cellules endothéliales mais une efficacité plus grande de CLDN1 pour l'entrée dans des cellules dérivées d'hépatome humain (Meertens et al., 2008). Plus encore, CLDN6 et CLDN9 mais pas CLDN1 sont exprimées dans les cellules mononucléées du sang périphérique, un site secondaire de réplication du VHC qu'on pense être un réservoir potentiel du VHC (Zheng et al., 2007).

Enfin, il faut noter que plusieurs lignées cellulaires qui sont résistantes à l'infection par le VHC expriment CLDN1, CD81 et SRBI, indiquant que d'autres facteurs sont requis pour l'entrée du VHC en plus de ceux déjà identifiés.

I.6.2 Internalisation de la particule virale et fusion avec la membrane endosomale

La liaison des virus enveloppés aux molécules de surface est suivie par la fusion de l'enveloppe lipidique avec la membrane cellulaire. Ce processus étroitement coordonné en temps et espace requiert des changements conformationnels drastiques dans les protéines de fusion, lesquels sont déclenchés par des facteurs cellulaires. Certains virus entrent dans les cellules cibles en fusionnant directement leur enveloppe avec la membrane plasmique tandis que d'autres procèdent par endocytose. Le VHC utilise une endocytose médiée par la clathrine (Blanchard et al., 2006), la fusion ne se produisant que dans les endosomes précoces

(Meertens et al., 2006) où elle est favorisée par un pH acide qui induit probablement des changements conformationnels dans les protéines d'enveloppe (Bartosch et al., 2003b; Hsu et al., 2003; Blanchard et al., 2006; Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006). Après fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale, le génome viral est libéré dans le cytosol. Il est important de noter que l'exposition de virions liés à la surface cellulaire à un pH acide puis à un pH neutre n'affecte pas l'infectivité du VHC (Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006), suggérant que les protéines du VHC ont besoin d'un élément déclencheur additionnel, tel que l'interaction avec un récepteur pour devenir sensible au pH bas. Du fait de leur appartenance à la famille des Flaviviridae, on pense que le mode de repliement des protéines d'enveloppe du VHC est semblable à celui des protéines de fusion de Classe II (Lindenbach et al., 2007) qui ont majoritairement une structure de type feuillet β plutôt qu'en hélice comme celles de la classe I. Elles ne sont pas clivées pendant la biosynthèse et ont un peptide de fusion interne avec une conformation en boucle. Elles sont synthétisées en complexe avec une glycoprotéine membranaire qui agit comme une chaperone. Le clivage de la protéine compagnon active le potentiel fusogène de la protéine de fusion. Chacune des deux glycoprotéines d'enveloppe semble avoir une activité chaperone pour son partenaire (Lavie et al., 2007) et toutes deux semblent intervenir dans le processus de fusion (Lavillette et al., 2007). Cette dernière étude montre que trois régions distinctes dans E1 et E2 coopèrent pour faire aboutir le processus intégral de fusion. Enfin, des mutations dans les domaines transmembranaires de E1 et E2 altèrent les propriétés de fusion des glycoprotéines d'enveloppe du VHC, peut-être en perturbant leur réorganisation oligomérique (Ciczora et al., 2007). L'établissement de la structure 3D des glycoprotéines du VHC permettra de mieux comprendre leur rôle dans l'entrée du virus.

1.6.3 Traduction de la polyprotéine virale

Le génome viral libéré dans le cytosol est traduit dans le RE par la machinerie ribosomale cellulaire en une polyprotéine d'environ 3010 aminoacides. Contrairement aux ARNm cellulaires dont la traduction est coiffe-dépendante, les molécules d'ARN viral naturellement dépourvues de coiffe comme celles des picornavirus et des flavivirus sont traduites par un processus médié par l'IRES (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). Les analyses structurales indiquent que l'IRES du VHC adopte une conformation tertiaire permettant sa liaison au complexe d'initiation de la traduction avec une forte affinité (Spahn et al., 2001). La traduction elle-même est initiée par la liaison directe d'une sous-unité 40S du ribosome à l'IRES. Celle-ci interagit avec l'ARN viral à des niveaux multiples dont des tiges, des

boucles, des pseudo-noeuds mais principalement avec le domaine III et le codon d'initiation. Ce complexe binaire se lie ensuite à eIF3 et au complexe ternaire eIF2:Met-tRNA_i:GTP pour former le complexe 48S. L'étape suivante est la formation du complexe 80S, elle requiert l'hydrolyse du GTP et l'attachement de la sous-unité 60S avant que ne se forme la première liaison peptidique (Suzuki et al., 2007).

D'autres facteurs en plus de ceux cités ci-haut modulent l'activité de l'IRES. Ainsi, il a été montré que des protéines cellulaires telles que la pyrimidine tract-binding protein (PTB) (Anwar et al., 2000), La autoantigen (Ali and Siddiqui, 1997; Isoyama et al., 1999; Ali et al., 2000) et poly-C binding protein (Fukushi et al., 2001a) se lient à l'IRES et modulent la traduction du VHC.

Des protéines virales interviennent également dans cette régulation. L'expression de Core inhibe la traduction du VHC du fait de sa liaison à un triplet de GGG dans la tige-boucle III_d (Shimoike et al., 1999; Tanaka et al., 2000; Shimoike et al., 2006). Ce qui suggère une régulation par une liaison compétitive de l'IRES par Core et la sous-unité 40S du ribosome (Shimoike et al., 1999; Tanaka et al., 2000; Li et al., 2003; Shimoike et al., 2006). Une autre étude pointe plutôt un effet régulateur non de la protéine Core elle-même mais plutôt de sa séquence codante par une interaction ARN-ARN (Wang et al., 2000). Il a été rapporté que NS4A, NS4B et NS5A aussi inhibent l'activité de l'IRES (Kato et al., 2002; Kalliampakou et al., 2005).

Enfin, les ARN interviennent dans la régulation de la traduction puisque la région 3'NTR du VHC et le microARN miR-122 respectivement la stimule (Bradrick et al., 2006) et l'inhibe (Jopling et al., 2006).

I.6.4 Maturation de la polyprotéine

Le principal produit de traduction du génome du VHC est un grand précurseur polyprotéique qui est mûri par des protéases virales et cellulaires en protéines structurales et non structurales. Les jonctions Core/E1, E1/E2, E2/p7, p7/NS2 sont clivées par des peptidases à peptide signal cellulaires localisées dans le RE dans la membrane duquel les différentes protéines vont se localiser (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Un clivage supplémentaire par une peptidase à peptide signal au niveau de l'extrémité C-terminale de Core le sépare de E1 et le libère de la membrane du RE (McLauchlan et al., 2002).

La maturation des protéines non structurales est réalisée par deux protéases virales: Le clivage entre NS2 et NS3 est une réaction intramoléculaire rapide médiée par la protéase NS2-3 qui sépare NS2 de la partie N-terminale de NS3. Les jonctions restantes sont traitées par une sérine protéase localisée dans les 180 résidus N-terminaux de la protéine NS3. La région NS3-NS5B est maturée par un clivage séquentiel: NS3/4A, NS5A/5B, NS4A/5A (Bartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1994b; Tanji et al., 1994; Failla et al., 1995). Le clivage de NS3/4A est intramoléculaire alors qu'il est intermoléculaire pour toutes les autres.

I.6.5 Réplication de l'ARN viral

La réplication de l'ARN du VHC démarre par la synthèse du brin (-) en utilisant le brin génomique comme matrice. Ce brin (-) va lui-même servir de matrice pour la synthèse du brin (+). Ces deux étapes sont réalisées par NS5B qui est une ARN-polymérase ARN dépendante. Cinq à dix brins d'ARN (+) de la progénie sont transcrits à partir d'un brin (-) matrice et sont utilisés pour la traduction, la réplication et l'assemblage. D'autres facteurs, cellulaires et viraux interviennent dans la réplication et dans la formation des complexes de réplication en association avec NS5B. Plusieurs groupes ont démontré une activité de réplication *in vitro* dans des complexes de réplication localisés dans des fractions membranaires de cellules contenant des réplicons subgénomiques (Ali et al., 2002; Lai et al., 2003; Miyanari et al., 2003; Aizaki et al., 2004). Ces systèmes sont des outils utiles pour la dissection biochimique de la réplication du VHC et une source pour l'isolement de complexes de réplication du VHC. Les études *in vitro* montrent que la synthèse d'ARN peut être initiée sans l'addition supplémentaire d'une matrice d'ARN (-) suggérant qu'elle est copurifiée avec le complexe de réplication (Ali et al., 2002; Hardy et al., 2003; Lai et al., 2003; Miyanari et al., 2003).

Des études de copréciptation et d'immunomarquage montrent l'ARN nouvellement synthétisé en association avec les protéines non structurales du VHC sous la forme de foyers distincts qui pourraient correspondre au réseau membranaire (Shi et al., 2003). L'expression de toutes les protéines virales dans le contexte de la polyprotéine induit des changements similaires au niveau de la membrane (Egger et al., 2002). De plus, des structures morphologiquement semblables ont été identifiées par microscopie électronique dans les hépatocytes de chimpanzés infectés par le VHC (Pfeifer et al., 1980). Ainsi, les complexes de réplication du virus pourraient exister sous la forme de réseau membranaire dérivé du RE dans les cellules infectées.

D'autre part, un nombre croissant d'éléments démontre une association entre la réplication de l'ARN et des domaines membranaires résistants au détergent appelés radeaux lipidiques. Ce sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides caractérisés par une insolubilité par les détergents (Simons and Ikonen, 1997, 2000; Simons and Toomre, 2000). Ces structures jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes biologiques notamment comme régulateurs et centrale d'organisation des cascades de mobilité membranaire et de transduction du signal, incluant l'entrée et l'assemblage de plusieurs virus notamment Ebola, le VIH, les virus influenza et le virus de Marburg (Barman et al., 2001; Bavari et al., 2002; Ding et al., 2003). Toutefois, le VHC pourrait être le premier exemple d'association des radeaux lipidiques à la réplication de l'ARN viral. Les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des sphingolipides inhiberaient la réplication du VHC, par le blocage de l'association des protéines non structurales avec les radeaux lipidiques (Sakamoto et al., 2005; Umehara et al., 2006). Il est maintenant admis que les protéines non structurales synthétisées dans le RE sont localisées dans les radeaux lipidiques membranaires quand elles sont activement engagées dans la réplication de l'ARN. Les analyses de sédimentation de membrane montrent que les protéines non structurales sont présentes dans le RE et l'appareil de Golgi mais que la réplication se fait réellement dans le premier compartiment (Aizaki et al., 2004). Des études supplémentaires pour déterminer les processus cellulaires impliqués dans la formation du complexe de réplication et dans la réplication du génome viral sont encore nécessaires pour la compréhension complète du mécanisme.

Les études menées avec les réplicons d'ARN ont montré que les plus grosses quantités d'ARN sont détectées pendant la phase de croissance des cellules, puis on observe une réduction significative à mesure qu'elles approchent de la confluence, suggérant que la réplication et la traduction du virus sont fortement dépendantes du métabolisme de la cellule hôte (Pietschmann et al., 2001). Les cellules Huh-7 qui ont été débarrassées des réplicons qui les transformaient par traitement à l'IFN, produisent des populations cellulaires qui sont plus permissives au réplicon testé. Ainsi, la combinaison d'un environnement cellulaire et de mutations adaptatives de l'ARN viral contribue très probablement à la réplication efficace de l'ARN viral en culture cellulaire.

En dehors de NS5B, plusieurs protéines virales participent à la réplication. NS3 est directement impliquée dans la synthèse de l'ARN, du fait de ses activités hélicase et NTPase. L'activité hélicase est impliquée dans le déroulement de l'intermédiaire de réplication qui peut être bicaténaire et ôte les structures secondaires pour permettre la copie correcte de la

matrice. L'activité NTPase est couplée à la fonction hélicase pour fournir l'énergie requise pour la destruction des duplexes d'ARN (Piccininni et al., 2002). L'intervention de NS4B dans le cycle viral reste à déterminer mais NS4B induit un réseau membranaire consistant en petites vésicules dans lesquelles l'ARN viral et les protéines non structurales nouvellement synthétisées sont localisées. NS4B pourrait donc jouer un rôle essentiel dans la formation du complexe de réplication du VHC (Egger et al., 2002). Un nombre croissant de données militent pour une intervention de NS5A dans la réplication de l'ARN viral. La région centrale de NS5A comporte une zone d'accumulation de mutations adaptatives qui augmentent l'efficacité de la réplication en culture cellulaire (Seeger, 2005; Appel et al., 2006). L'ancrage de NS5A dans la membrane par son domaine amino-terminal et son interaction avec NS5B sont essentiels pour la réplication de l'ARN viral (Shirota et al., 2002; Shimakami et al., 2004).

Plusieurs protéines cellulaires interagissant avec NS5A interviennent dans la réplication de l'ARN viral. On peut citer les protéines humaines A et B associées aux vésicules associées aux protéines de membranes (VAP-A et B) (Gao et al., 2004; Hamamoto et al., 2005), FKBP8 (Okamoto et al., 2006), FBL2 (Wang et al., 2005) entre autres. VAP-A et B sont des protéines localisées dans le RE et l'appareil de Golgi; elles interagissent directement avec NS5A et NS5B et induiraient la formation de complexes de réplication fonctionnels du VHC. FKBP8, un membre de la famille des protéines de liaison au FK506, et Hsp90 forment un complexe avec NS5A contribuant à la réplication de l'ARN viral. Il a été montré que les statines qui limitent la production de mévalonate par inhibition de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl CoA reductase entraînent une inhibition de la réplication de l'ARN du VHC qui peut être corrigée par l'addition de geranylgeraniol, suggérant que la réplication virale requiert des protéines geranylgeranylées. Ainsi FBL2, une protéine geranylgeranylée a été identifiée comme un interactant de NS5A (Wang et al., 2005).

Parmi les facteurs cellulaires qui interagissent avec NS5B et participent à la réplication du VHC, on peut citer la cyclophiline B (Watashi et al., 2005), p68 (Goh et al., 2004), la nucléoline (Hirano et al., 2003; Shimakami et al., 2006) et hnRNP A1 (Kim et al., 2007). La cyclophiline B, une peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, interagit avec la région C-terminale de NS5B pour stimuler directement son activité de liaison à l'ARN contribuant ainsi à une réplication efficace de l'ARN viral. La liaison de p68 à NS5B permet la translocation de cette ARN hélicase du noyau vers le cytoplasme où le complexe p68-NS5B intervient dans la réplication. La nucléoline, un marqueur nucléolaire a deux domaines d'interaction avec NS5B

par lesquels elle favorise la réplication virale. hnRNP A1, une ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène, interagit aussi avec la septine 6 et les extrémités 5' et 3'NTR de l'ARN du VHC; avec la septine 6, elles jouent un rôle important dans la réplication du virus par des interactions ARN-protéine et protéine-protéine. Bien d'autres composants cellulaires encore lient l'ARN du VHC; c'est le cas de la PTB qui module ainsi tant la réplication que la traduction IRES dépendante (Ali and Siddiqui, 1995; Ito and Lai, 1997; Tsuchihara et al., 1997; Ito and Lai, 1999; Murakami et al., 2001).

La région 3'NTR intervient également dans la réplication puisque la délétion de la région riche en pyrimidines ou de l'une quelconque des tiges-boucles de la région 3'X entraîne l'arrêt de la réplication virale (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000). Des régions de l'ARN viral agissant en cis sur la réplication (cis-acting regulatory elements ou CRE) ont été mises au jour. Ainsi, les 125 premiers nucléotides de la région 5'NTR sont suffisants pour la réplication qui est toutefois optimisée en présence de la séquence entière (Friebe et al., 2001). Plus récemment, des études ont rapporté l'implication de tige-boucles de la partie C-terminale de NS5B dans la réplication du génome viral; l'une par son interaction avec la tige-boucle SL2 de la région X (You et al., 2004; Friebe et al., 2005; You and Rice, 2008), l'autre par son interaction avec la polymérase virale (Lee et al., 2004).

I.6.6 Assemblage et relargage des virions

L'assemblage du VHC et la structure des virions sont largement méconnus. Par analogie aux virus apparentés, le virion mature comporte probablement une nucléocapside et une membrane externe composée d'une membrane lipidique et de protéines d'enveloppe. Ils ont un diamètre de 40 à 70 nm. Ces observations furent récemment confirmées par microscopie électronique de particules infectieuses produites en culture cellulaire. Le VHC circule sous plusieurs formes dans les séras de patients infectés: libres, liées aux LDL et VLDL, liées aux immunoglobulines ou encore des nucléocapsides non enveloppées différant par leurs propriétés antigéniques et physicochimiques (Kaito et al., 1994; Shimizu et al., 1996; Maillard et al., 2001; Andre et al., 2002).

Des systèmes d'expression mammifère, insecte, levure, bactérie ou des lysats de réticulocytes et des protéines recombinantes purifiées ont été utilisés pour investiguer l'assemblage de la capsid du VHC (Baumert et al., 1998; Acosta-Rivero et al., 2001; Kunkel et al., 2001; Lorenzo et al., 2001; Blanchard et al., 2003; Klein et al., 2004; Majeau et al., 2004; Matsuo et al., 2006). Les résultats montrent que les particules immunogéniques de type nucléocapside

sont de tailles hétérogènes, allant de 30 à 80 nm de diamètre. La moitié N-terminale de la protéine Core est importante pour la formation de la nucléocapside (Kunkel et al., 2001; Klein et al., 2004; Majeau et al., 2004). L'assemblage de cette nucléocapside implique généralement l'oligomérisation de Core et l'encapsidation de l'ARN génomique. On pense qu'il se fait par l'interaction de Core avec l'ARN viral qui en outre devrait être essentielle pour passer de la réplication du génome à l'empaquetage. En fait, Core peut lier l'ARN (+) du VHC au niveau des domaines I, III et des nucléotides 24-41 (Tanaka et al., 2000).

Une fois, la nucléocapside formée dans le cytoplasme, elle acquiert une enveloppe pendant son bourgeonnement à travers les membranes intracellulaires. Cette hypothèse a été confirmée par l'expression des protéines structurales du VHC à l'aide de vecteurs virus recombinants qui a permis de générer des particules de type viral aux propriétés ultrastructurales similaires à celles des virions du VHC. L'empaquetage de ces particules de type viral dans des vésicules intracellulaires suite au bourgeonnement à partir du RE a été constaté (Baumert et al., 1998; Ezelle et al., 2002; Murakami et al., 2006). On pense que les interactions de Core avec les protéines d'enveloppe E1E2 déterminent la morphologie virale. Les études de cartographie ont démontré l'importance des régions C-terminales de E1 et Core pour cette interaction (Lo et al., 1996; Ma et al., 2002). Les séquences de ces protéines n'étant pas bien conservées dans les différents isolats du VHC, les interactions entre Core et E1 pourraient dépendre plus de l'hydrophobicité que de la spécificité de la séquence elle-même. Enfin, l'interaction entre Core oligomérisé et la glycoprotéine E1 est médiée par la boucle cytoplasmique de la forme polytopique de la protéine E1 (Nakai et al., 2006).

Les particules du VHC sont libérées de la cellule infectée par sécrétion. Les protéines structurales du VHC ont été observées dans le RE et l'appareil de Golgi (Serafino et al., 2003). De plus, les complexes liés aux glycanes qui transitent par l'appareil de Golgi ont été détectés à la surface des particules virales isolées dans les sera de patients (Sato et al., 1993).

I.6.7 VHC et métabolisme lipidique

Le cycle viral est fortement dépendant du métabolisme lipidique.

I.6.7.1 Réplication du VHC et voie de synthèse du Mevalonate

On constate notamment que la réplication de l'ARN du VHC requiert l'intégrité de la voie de synthèse du Mevalonate. En effet, le traitement de cultures cellulaires du VHC avec la lovastatine, un inhibiteur de HMG CoA reductase qui intervient dans la biosynthèse du Mevalonate, entraîne l'inhibition de la réplication de l'ARN viral, qui est restaurée par

l'addition de geranylgeraniol (Ye et al., 2003). Des résultats similaires ont été retrouvés par d'autres équipes (Kapadia and Chisari, 2005; Ikeda et al., 2006). De plus, FBL2 (F-box and leucine-rich repeat protein 2) qui appartient à une famille de protéines intervenant dans les processus d'ubiquitination, fut identifiée comme un interactant geranylgeranylé de NS5A requis pour la réplication de l'ARN viral (Wang et al., 2005). (**Figure 14**).

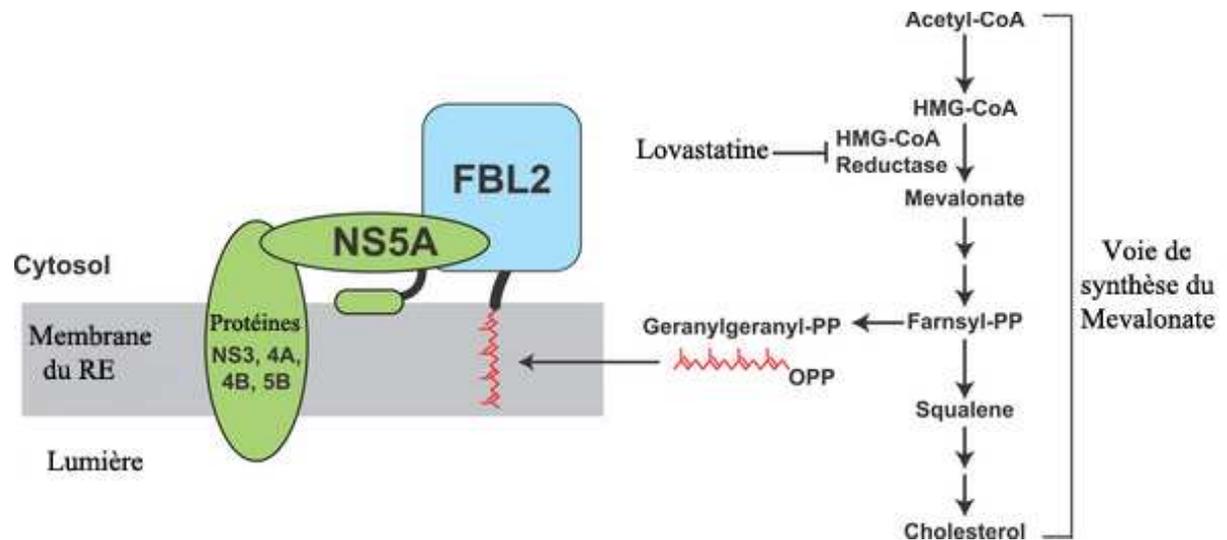


Figure 14: Réquisition de la voie de synthèse du Mevalonate pour la réplication du VHC

Les cellules sont capables de synthétiser du cholestérol par la voie de synthèse du Mevalonate. Cette voie produit aussi le lipide geranylgeranyle qui est attaché au COOH terminal de FBL2. FBL2-geranylgeranylé est lié à NS5A dans une interaction requise pour la réplication de l'ARN du VHC. La lovastatine, un inhibiteur de HMG-CoA reductase bloque la voie de synthèse du Mevalonate. Il en résulte une déplétion des cellules en geranylgeranyl-lipide et une inhibition de la réplication du VHC. PP, pyrophosphate. Adapté de (Ye, 2007)

I.6.7.2 Assemblage des VLDL et sécrétion du VHC

Récemment, des vésicules membranaires contenant le complexe de réplication du VHC furent isolées de cellules Huh7 transformées par un réplicon du virus; les analyses protéomiques les ont révélées enrichies en ApoB, ApoE et MTP (Microsomal Transfer Protein) qui sont des protéines requises pour l'assemblage des VLDL (Huang et al., 2007). La co-localisation de la réplication du virus et de l'assemblage des VLDL paraissait due à la nécessité de co-assemblage et de sécrétion des VLDL et des particules de VHC. (**Figure 15**). Ainsi, quand des cellules Huh7 produisant constitutivement du VHC infectieux (Cai et al., 2005) furent traitées par un inhibiteur de MTP ou des ARN interférents spécifiques d'ApoB, la sécrétion tant des VLDL que du VHC fut inhibée (Huang et al., 2007).

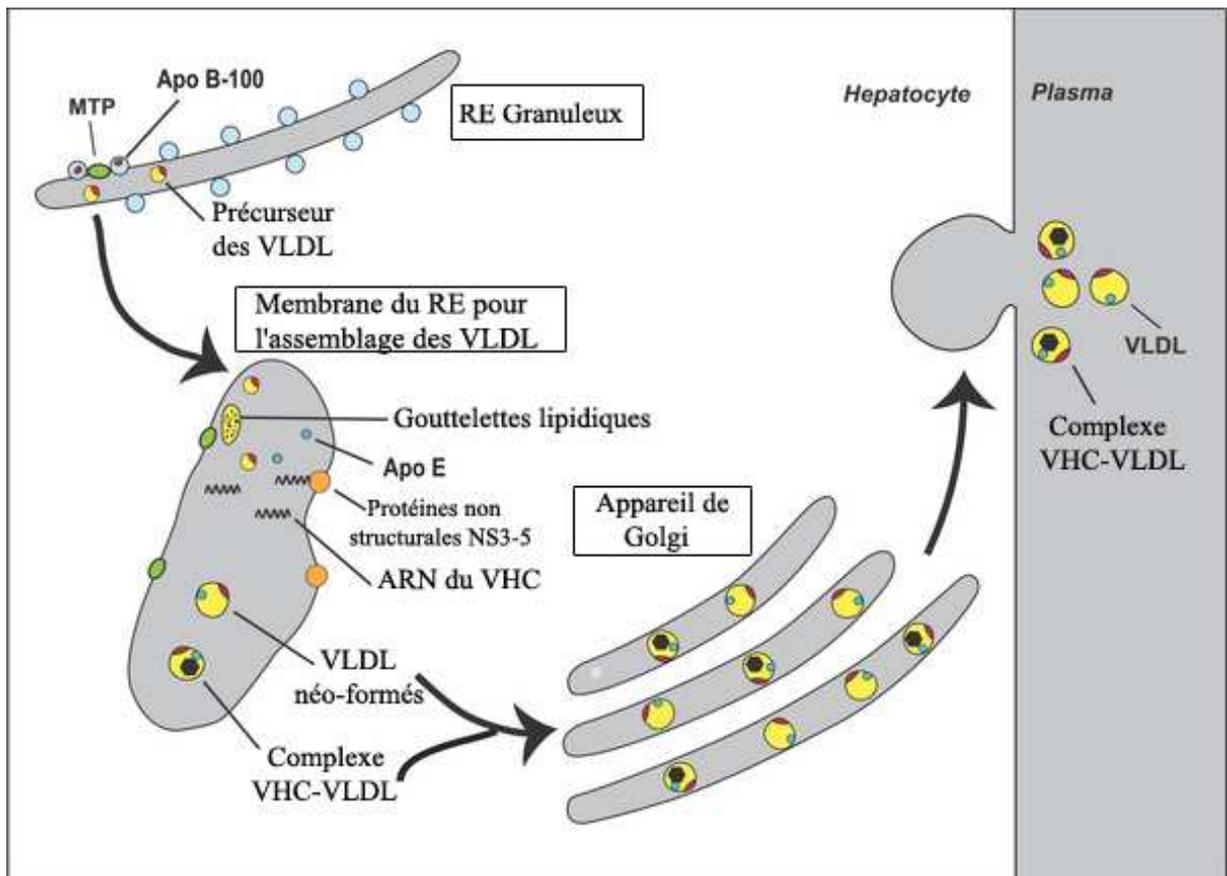


Figure 15: Le VHC se réplique dans des membranes du RE impliquées dans l'assemblage des VLDL et est sécrété avec les VLDL.

L'assemblage des VLDL commence avec la synthèse de ApoB dans le RE granuleux, résultant en la formation d'un précurseur VLDL qui contient une faible quantité de lipides. Dans la lumière du RE, ce précurseur est associé aux gouttelettes lipidiques (enrichies en triglycérides et cholestérol) pour générer les VLDL naissants. Cette réaction est médiée par le MTP. Les particules naissantes de VLDL, qui contiennent ApoE et ApoB, sont sécrétées dans le plasma par exocytose. Les membranes du RE impliquées dans l'assemblage des VLDL sont aussi enrichies en protéines non structurales et en ARN du VHC. La répllication du VHC sur ces membranes pourrait donc permettre son attachement ou son incorporation au VLDL permettant sa co-sécrétion avec les VLDL. Adapté de (Ye, 2007)

Néanmoins, cette exigence de sécrétion de VLDL pour la production du VHC en culture n'est pas démontrée chez les patients infectés quoique les particules virales dans le sérum soient complexées aux VLDL (Andre et al., 2002; Nielsen et al., 2006). La nature de l'association entre le VHC et les VLDL n'est pas élucidée mais les résultats des études menées avec du VHC isolé de patients infectés suggère que le virus pourrait résider dans le cœur lipidique des VLDL, puisque la délipidation de particules lipoprotéiques est requise pour observer des particules de type viral (Andre et al., 2002). Plusieurs récepteurs cellulaires sont requis pour l'entrée du VHC dans les cellules. Il est intéressant de noter que la quantité de CD81

exprimée à la surface de la cellule est affectée par la teneur en cholestérol cellulaire. Quand les cellules sont déplétées en cholestérol par un traitement à la méthyl- β -cyclodextrine, la quantité membranaire de CD81 est abaissée entraînant une réduction dans l'entrée du VHC (Kapadia et al., 2007).

I.6.7.3 Récepteurs de lipoprotéines et entrée du virus

Par ailleurs, du fait de l'intervention de CD81 et Claudine1 seulement dans les phases tardives de l'entrée du virus (Cormier et al., 2004b; Blanchard et al., 2006; Evans et al., 2007; Harris et al., 2008), les récepteurs des lipoprotéines pourraient être impliqués dans la phase précoce compte-tenu de l'association entre VHC et lipoprotéines dérivées de VLDL.

Ainsi, le récepteur des LDL qui joue un rôle essentiel dans l'endocytose médiée par la clathrine des particules lipoprotéiques dérivées des VLDL serait impliqué dans l'entrée du virus. Des études ont démontré que la liaison et l'intégration de particules virales isolées de patients infectés corrélaient bien avec l'activité du récepteur des LDL à la surface de la cellule (Agnello et al., 1999; Wunschmann et al., 2000; Andre et al., 2002; Molina et al., 2007). Néanmoins, cette entrée du virus médiée par le récepteur des LDL n'entraînant pas d'infection productive, des investigations supplémentaires sont indispensables pour démontrer clairement l'implication de ce récepteur.

SR-BI est un autre récepteur de lipoprotéine (Acton et al., 1996; Gillotte-Taylor et al., 2001) impliqué dans l'entrée du VHC. Il a en effet été démontré que l'entrée du VHCcc est bloquée par des anticorps dirigés contre SR-BI (Grove et al., 2007; Kapadia et al., 2007; Zeisel et al., 2007b) et inhibée par un excès de LDL oxydés (von Hahn et al., 2006). Par ailleurs, l'interaction du VHC et du SR-BI ne dépend pas des lipoprotéines associées au virus du fait d'une interaction directe avec E2 (Scarselli et al., 2002).

I.6.7.4 VHC et gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques sont des organelles de stockage trouvées chez tous les eucaryotes. (**Figure 16**). Il y a une dizaine d'années, des études ont montré que la protéine Core avait une localisation cytoplasmique où elle s'associait à la membrane du RE ou à la surface des gouttelettes lipidiques (Moradpour et al., 1996; Barba et al., 1997). Il a récemment été montré que les gouttelettes lipidiques sont directement impliquées dans la production de virions infectieux (Miyinari et al., 2007).

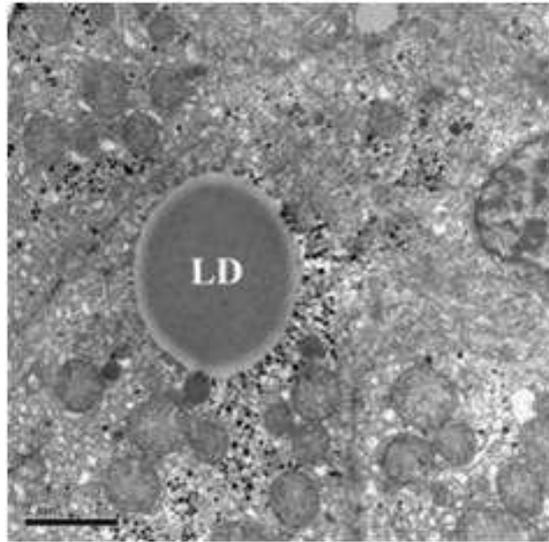


Figure 16: Micrographie électronique d'une biopsie hépatique mettant en évidence une gouttelette lipidique (LD Lipid Droplet).

Adapté de (Roingeard and Hourieux, 2008)

Les auteurs ont démontré que la protéine Core recrute les protéines non structurales et les complexes de réplication au niveau des gouttelettes lipidiques associées aux membranes et que ce recrutement est essentiel pour la production de virus JFH-1 infectieux. (Figure 17).

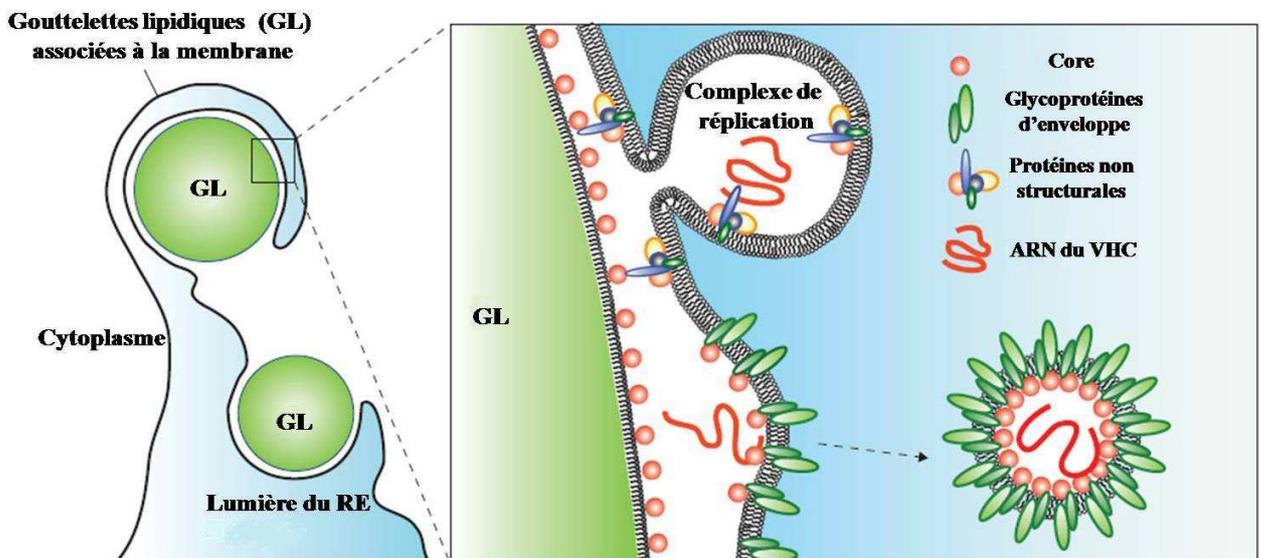


Figure 17: Modèle pour la production de virions infectieux du VHC

Core est principalement localisé dans la monocouche membranaire qui entoure la gouttelette lipidique (GL). Le VHC induit la superposition des GL sur les bicouches membranaires dérivées du RE (GL associées à la membrane) où Core va recruter les protéines NS et le complexe de réplication. Ces protéines NS peuvent alors y participer à la production de virions infectieux. E2 est aussi localisé aux abords des gouttelettes lipidiques. L'assemblage du virion se fait par le biais de ces associations dans un environnement local. Adapté de (Miyazari et al., 2007)

Une autre étude a trouvé une corrélation entre le blocage de l'association de Core aux gouttelettes lipidiques et la diminution de production du virus JFH-1 (Boulant et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'association de Core et des gouttelettes lipidiques joue un rôle essentiel à certaines étapes de la morphogénèse du virion. Il est possible que la membrane du RE permettant la formation des gouttelettes lipidiques fournisse une plateforme pour l'assemblage de la nucléocapside. Enfin, il a été rapporté que Core lie et active le domaine de liaison à l'ADN du récepteur α de l'acide rétinoïque, un régulateur transcriptionnel contrôlant de nombreuses fonctions cellulaires dont la lipogénèse (Tsutsumi et al., 2002; Yamaguchi et al., 2005). Elle diminue en outre l'expression du récepteur α activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR α), un récepteur nucléaire régulant plusieurs gènes responsables de la dégradation des acides gras (Tsutsumi et al., 2002). Il a récemment été montré que les sujets infectés par le VHC ont des niveaux hépatiques d'ARNm de PPAR α plus bas que la normale (Dharancy et al., 2005; de Gottardi et al., 2006). Core serait aussi impliquée dans l'accumulation de lipides dans le foie de plusieurs lignées de souris transgéniques, par inhibition de la protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP) qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage des VLDL, entraînant l'accumulation de TG et le blocage de la formation des VLDL (Perlemuter et al., 2002).

I.7 PHYSIOPATHOLOGIE

I.7.1 Diagnostic de l'infection par le VHC

Infection aigue

Chez les patients avec une suspicion d'hépatite C aigue, on recherche à la fois les anticorps anti-VHC par une technique immunoenzymatique et l'ARN du VHC par une technique sensible (limite inférieure de détection ≥ 50 UI/ml) (Pawlotsky, 2002b). Quatre profils peuvent être observés selon la présence ou l'absence de l'un de ces marqueurs. La présence d'ARN du VHC en absence d'anticorps est fortement indicative d'une infection aigue, qui sera confirmée par une séroconversion quelques jours voire une semaine plus tard. Les patients développant une hépatite C aigue peuvent aussi avoir une positivité de l'ARN et des anticorps au moment du diagnostic. Il est difficile dans ce cas de distinguer une hépatite C aigue d'une hépatite C chronique en phase d'acutisation. La forme aigue est très improbable en l'absence d'anticorps et d'ARN du VHC ou si les anticorps sont présents en l'absence d'ARN. On devra cependant répéter le test quelques semaines plus tard chez ces patients car l'ARN du VHC peut être temporairement indétectable du fait d'un contrôle partiel ou

transitoire de la réplication virale par le système immunitaire avant le passage à la chronicité (Lavillette et al., 2005a). En dehors de ces cas, la présence d'anticorps anti-VHC en l'absence d'ARN viral signe une résolution spontanée de l'infection. Ce profil ne pouvant être différencié d'un faux positif immunoenzymatique, sa prévalence exacte est inconnue.

Infection chronique

Chez les patients présentant une symptomatologie de maladie chronique du foie, l'hépatite C chronique est affirmée en présence simultanée d'ARN et d'anticorps anti-VHC (Pawlotsky et al., 1998). Une détection de réplication virale en absence d'anticorps anti-VHC est exceptionnelle avec les techniques immunoenzymatiques actuelles, et presque exclusivement observée chez les immunodéprimés profonds, chez les patients hémodialysés ou les personnes développant une agammaglobulinémie (Lok et al., 1993; Thio et al., 2000).

Chez les patients ne présentant pas d'indication de thérapie ou chez qui l'usage de drogues antivirales est contre-indiquée, les tests virologiques n'ont aucune valeur pronostique. Ils ne peuvent donc pas être utilisés pour prédire le cours naturel de la maladie ou le début des manifestations extrahépatiques. Chez les patients non traités, la sévérité de l'inflammation hépatique et la fibrose peuvent être évaluées tous les trois voire cinq ans par une biopsie hépatique ou des méthodes d'investigation utilisant les ultrasons (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002).

I.7.1.1 Détection de l'ARN du VHC

L'OMS a établi une norme internationale pour une standardisation universelle de la quantification de l'ARN du VHC en raison de la grande disparité précédemment observée pour ce paramètre. Une Unité Internationale (UI) d'ARN du VHC a été définie, qui est désormais utilisée dans tous les kits de dosage quantitatif de l'ARN. Cette standardisation permet le suivi des recommandations dérivées et des indications issues des essais cliniques ainsi que leur application en clinique quelque soit le kit utilisé.

Détection qualitative de l'ARN du VHC

Les tests qualitatifs de détection sont basés sur l'amplification d'une région cible en utilisant une PCR classique, la «real-time» PCR (PCR en temps réel) ou l'amplification médiée par la transcription (TMA) (Pawlotsky, 2002a). L'ARN du VHC est extrait et rétrotranscrit en ADNc, qui est ensuite traité par un cycle de réactions aboutissant à la génération d'un grand nombre de copies, ce qui permet sa détection. Les techniques basées sur la PCR permettent la synthèse de copies d'ADN double-brin tandis que des copies d'ARN simple brin sont

généérées dans le TMA. La détection des produits amplifiés est obtenue par l'hybridation des amplicons sur des sondes spécifiques après la réaction. Dans la «real-time» PCR, chaque cycle d'amplification conduit à l'émission d'un signal fluorescent et le nombre de signaux par cycle est proportionnel à la quantité d'ARN de l'inoculat (Martell et al., 1999; Komurian-Pradel et al., 2001; Pawlotsky, 2002a). Le seuil de détection de ces tests qualitatifs est 50 UI d'ARN/ml ou moins et est la même pour tous les génotypes mais en plus ils présentent une limite de détection plus basse que celle des tests quantitatifs actuellement disponibles.

Détection quantitative d'ARN du VHC

L'ARN du VHC peut être quantifié par des techniques d'amplification de régions cibles du VHC (PCR compétitive ou real-time PCR) ou des techniques d'amplification du signal (techniques utilisant l'ADN branché (bdNA)). La technique la plus prometteuse pour le futur est la PCR en temps réel automatisé.

I.7.1.2 Génotypage du VHC

On peut encore l'appeler détermination moléculaire du VHC. La méthode de référence est le séquençage direct des régions génomiques de NS5B ou de E1 avec des protocoles maison suivi d'alignements de séquence avec des séquences prototypes et d'analyses phylogénétiques (Simmonds, 1999; Simmonds et al., 2005). En clinique, le génotype du VHC peut être déterminé avec divers kits commerciaux qui permettent le séquençage de la région 5' NTR ou l'hybridation inverse utilisant des sondes spécifiques à chaque génotype localisées dans la région 5'NTR (Stuyver et al., 1996; Zheng et al., 2003). Les échecs de génotypage sont rares avec ces techniques mais les échecs dans la détermination du sous-type surviennent dans 10 à 25% des cas; elles sont plus liées à la région étudiée qu'à la technique utilisée (la 5'NTR étant hautement conservée dans le même génotype mais considérablement variable entre les différents génotypes). Ces erreurs n'ont pas de conséquences cliniques puisque seul le génotype est l'un des paramètres pris en compte pour arrêter une décision thérapeutique.

I.7.1.3 Les tests sérologiques

Détection des anticorps anti-VHC

Elle se fait dans le plasma ou le sérum par une technique immunoenzymatique qui permet de détecter des anticorps dirigés contre des épitopes variés du VHC. Des antigènes recombinants sont utilisés pour capturer les anticorps anti-VHC circulants sur des microbilles au fond de plaques de microtitration. La présence d'anticorps anti-VHC est révélée par des anti-anticorps marqués avec une enzyme qui catalyse la transformation d'un substrat en un composé coloré.

Le rapport de la densité optique de la réaction (DO échantillon/DO control interne) est proportionnel à la quantité d'anticorps de l'inoculat (Pawlotsky, 2002b). La spécificité des tests actuels est de 99% (Colin et al., 2001). Leur sensibilité est plus difficile à déterminer du fait du manque d'une méthode standard mais elle est excellente chez les patients immunocompétents. Ces méthodes peuvent être automatisées et adaptées pour de grandes séries.

Détermination sérologique du génotype du VHC

Le génotype du VHC peut être déterminé par la recherche d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques du génotype avec des tests immunoenzymatiques par compétition. Le test actuellement disponible (Murex HCV serotyping 1-6 HC02, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) identifie le type (1-6) mais ne discrimine pas les sous-types, et fournit des résultats interprétables chez environ 90% des patients immunocompétents infectés chroniques par le VHC (Pawlotsky et al., 1997). Une réactivité sérologique croisée peut être observée mais elle résulterait plus d'une infection par des souches appartenant à des génotypes différents ou de la résolution de l'infection par un génotype alors que persiste la virémie de l'autre.

I.7.1.4 L'infection occulte par le VHC

Les quatre dernières années ont vu l'émergence d'une nouvelle notion dans l'infection par le VHC: l'infection occulte. L'apparition de ce concept a été rendue possible par la mise au point de tests de recherche capables de détecter de plus faibles quantités d'ARN (≤ 2 UI ou ≤ 10 génomes viraux/mL) que les kits utilisés en routine clinique. Un de ces tests comporte: (1) Une transcription inverse d'un ARN d'excellente qualité extrait du sérum ou du plasma, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) voire du tissu hépatique; (2) une amplification directe et nichée de l'ADNc obtenu par PCR avec des amorces spécifiques de différentes régions du génome; (3) la validation des produits d'amplification par l'hybridation des acides nucléiques à des sondes d'ADN recombinant du VHC. L'utilisation de ces techniques a permis la détection d'ARN du VHC chez des patients après plusieurs années de guérison apparente (disparition des signes cliniques et biochimiques) (Pham et al., 2004; Radkowski et al., 2005).

Même si ces résultats doivent être considérés avec prudence dans l'attente de travaux plus approfondis sur l'incidence de cette infection occulte sur le devenir du malade, ce nouveau concept pourrait ébranler la norme établie selon laquelle la résolution complète du VHC

(spontanée ou induite par la thérapie) serait indicative d'une guérison de la maladie mais également les protocoles en cours dans les banques de sang voire le prélèvement d'organes.

Pour certains auteurs, la persistance de la réplication dans les hépatocytes et les tissus lymphoïdes entraînerait une stimulation antigénique continue du système immunitaire chez les patients immunocompétents qui en retour permettrait à l'hôte de maintenir sous contrôle cette infection silencieuse. Ce raisonnement est renforcé par la démonstration de réponses proliférative et cellulaire T cytotoxique spécifique du VHC chez les personnes anciennement infectées plusieurs années après leur guérison (Takaki et al., 2000; Quiroga et al., 2006). D'autre part, la persistance de la réplication du VHC associée à la présentation continue d'antigènes du VHC par les cellules B infectées et les monocytes pourraient contribuer à la tolérance immune avec comme résultante la persistance du virus. Néanmoins, dans un contexte d'immunosuppression, de thérapie immunomodulatrice ou de co-infection, la persistance de la réplication au lieu de provoquer les réponses cellulaires T souhaitées pourrait représenter un risque potentiel de réactivation du virus, comme cela a été décrit pour d'autres virus tels que le virus herpétique type 6 (Caserta et al., 2004).

I.7.2 Pathogénies associées au VHC

De nombreuses manifestations extrahépatiques ont été rapportées dans l'histoire naturelle de l'infection par le VHC. Jusqu'à 40 à 74% des patients infectés pourraient développer au moins une manifestation extrahépatique au cours de leur maladie. La plus fréquente est la cryoglobulinémie mixte mais on rapporte aussi des désordres lymphoprolifératifs, des manifestations dermatologique, endocrinienne et rhumatologique (Nocente et al., 2003; Zignego et al., 2007).

I.7.2.1 Cryoglobulinémie mixte (CM)

C'est le plus connu et le plus étudié des syndromes associés à l'infection par le VHC. Les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui précipitent de façon réversible à des températures inférieures à 37°C. Les cryoprécipités contiennent habituellement de grandes quantités d'antigènes et/ou d'anticorps spécifiques du VHC (Misiani et al., 1992). La CM s'accompagne parfois d'une vascularite à complexes immuns, touchant essentiellement les vaisseaux de petit calibre, avec un infiltrat inflammatoire à prédominance lymphocytaire présent majoritairement autour de ces vaisseaux et infiltrant peu leur paroi. Les cryoglobulines peuvent être trouvées chez 19 à 50% des patients (Lunel et al., 1994; Wong et al., 1996) et leur prévalence augmente avec la durée de la maladie mais seule une faible

proportion (<15%) développent des signes cliniques (Pawlotsky et al., 1995). Les cryoglobulines peuvent déterminer une grande variété de manifestations cliniques, les plus communes étant malaise général, arthralgies et fatigue. Elles peuvent toucher la peau, le rein et le système nerveux.

I.7.2.2 Désordres lymphoprolifératifs

Une autre association fréquemment rapportée est celle de l'infection par le VHC et des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) (Dammacco et al., 1998; Mele et al., 2003). La CM peut être un désordre intermédiaire puisqu'il a été rapporté que des formes persistantes de cryoglobulinémie évoluent en désordres hématologiques plus graves. On a retrouvé une virémie VHC positive chez environ 35% des patients avec un lymphome B et presque 90% des patients à LNH (Dammacco et al., 2000). Mais il est à ce jour prématuré, au regard de la grande disparité des résultats des études menées, de conclure formellement à un lien entre VHC et hémopathies malignes (Izumi et al., 1997; Ascoli et al., 1998). Pour le mécanisme, on pense que l'infection chronique par le VHC favoriserait l'expansion clonale de lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines (cryoglobulines) sans exclure une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux résultant en une mutation activant des oncogènes et entraînant le LNH. Une autre possibilité est l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes infectés par le VHC par la translocation t(18;14) entraînant la surexpression de l'oncogène bcl2 qui, associée à la mutation d'un autre oncogène (myc entre autres) pourrait conduire au développement du lymphome (Ellis et al., 1995; Zignego et al., 2000).

I.7.2.3 Manifestations dermatologiques

Porphyrie cutanée tardive

C'est une pathologie rare caractérisée par une anomalie du métabolisme des porphyrines, liée à un déficit enzymatique en uroporphyrinogène décarboxylase dont il existe deux types: une forme familiale à transmission autosomique dominante caractérisée par un déficit enzymatique dans les hépatocytes et les érythrocytes ainsi qu'une forme sporadique où le déficit n'est trouvé que dans les hépatocytes. On a une surproduction et une accumulation d'uroporphyrine dans le sang et les urines des patients. La maladie est caractérisée par des manifestations cutanées très évocatrices avec des éruptions bulleuses sur les territoires photoexposés (visage et dos des mains). La prévalence du VHC chez les patients atteints de porphyrie est forte, de l'ordre de 40 à 50% en fonction du pays (Fargion et al., 1992; Colin et al., 2001). Le VHC paraît ne pas induire directement une altération du métabolisme des

porphyrines mais pourrait la favoriser chez les personnes prédisposées (O'Reilly et al., 1996). Certains auteurs suggèrent que la porphyrie cutanée tardive pourrait résulter de la surcharge hépatique en fer induite par l'infection par le VHC (Bonkovsky et al., 1998). Il faut aussi noter que les plus fortes prévalences de porphyrie cutanée ont été trouvées chez les patients dont l'hépatite C était au stade cirrhose, suggérant que la cirrhose pourrait jouer un rôle dans son développement (Cacoub et al., 2000).

Lichen plan

C'est une éruption prurigineuse récurrente caractérisée par des papules violacées qui peuvent se développer sur toutes les parties de la peau (bras, tronc, parties génitales, crâne) mais aussi au niveau des muqueuses particulièrement la muqueuse orale.

La biopsie montre une infiltration lymphocytaire (CD4+) dans l'épiderme supérieur, avec une dégénérescence vacuolaire de l'épithélium basal et la présence de corps acidophiles représentés par des kératocytes apoptotiques (Thornhill, 2001). La prévalence du VHC chez les patients atteints de lichen plan oral (LPO) est de 27% (Thornhill, 2001). L'ARN du VHC a été retrouvé dans les biopsies de la muqueuse buccale de patients supportant l'association du VHC avec le LPO (Nagao et al., 1998). Des auteurs ont aussi décrit une association entre le LPO et les anticorps anti-cardiolipine chez les patients infectés par le VHC mais d'autres études n'ont trouvé aucune corrélation (Prieto et al., 1996; Nagao et al., 2002).

I.7.2.4 Manifestations endocriniennes

La thyroïde

Le lien entre l'infection par le VHC et les maladies thyroïdiennes n'est pas formellement établi mais la pathologie thyroïdienne est plus fréquente chez les personnes infectées par le VHC que dans la population générale (Huang et al., 1999). Environ 13% des patients infectés par le VHC présentent une hypothyroïdie et près de 25% ont des anticorps anti-thyroïdiens (Antonelli et al., 2004).

La thérapie antivirale peut aussi induire une maladie thyroïdienne ou démasquer une maladie autoimmune (maladie de Graves, thyroïdite de Hashimoto) (Fernandez-Soto et al., 1998; Prummel and Laurberg, 2003). La fonction thyroïdienne se normalise à l'arrêt du traitement chez la moitié des patients qui développent une hypothyroïdite iatrogène. Le principal facteur de risque pour la survenue d'une pathologie thyroïdienne au cours de la thérapie antivirale est une positivité antérieure aux anticorps anti-thyroïdiens (anti-peroxydase) particulièrement

chez les personnes âgées de sexe féminin (Deutsch et al., 1997). Les personnes développant une maladie thyroïdienne secondaire à la thérapie antivirale pourraient être génétiquement prédisposées (Prummel and Laurberg, 2003).

La thérapie antivirale est contre-indiquée en cas de pathologie thyroïdienne non contrôlée par l'hormonothérapie et la présence d'autoanticorps anti-thyroïdiens sans manifestations cliniques est une contre-indication relative de la thérapie antivirale.

Le diabète

Le diabète est plus souvent retrouvé chez les personnes infectées chroniques par le VHC que dans la population générale (Mason et al., 1999; Knobler et al., 2000) mais pour certains auteurs, le VHC n'est qu'un facteur de risque du diabète, indépendant de la pathologie hépatique (Mason et al., 1999). D'autres ont rapporté que le diabète était fortement associé à une fibrose hépatique avancée ou à une cirrhose (Caronia et al., 1999).

I.7.2.5 Manifestations rhumatologiques

Elles sont courantes dans l'infection chronique par le VHC. Athralgies et/ou arthrites sont retrouvées chez 74% des patients. On retrouve une implication musculaire, fréquente dans la sensation de fatigue des malades et dans 10% des cas de fibromyalgies (Rivera et al., 1997). Elles peuvent résulter d'un processus autoimmunitaire (CM) ou survenir de façon indépendante. Plusieurs études ont décrit une sialadénite lymphocytaire chronique similaire à la sialadénite associée au Syndrome de Sjögren (SS) idiopathique chez 50% des patients infectés par le VHC (Haddad et al., 1992). Près de 6% des patients avec un SS sont séropositifs pour le VHC contre environ 1% dans la population générale.

I.7.3 Immunopathogénèse de l'infection par le VHC

I.7.3.1 Réponses immunitaires innées et échappement viral

L'infection virale des cellules cibles initie une série d'événements intracellulaires qui aboutit à l'établissement dans les cellules infectées et les cellules avoisinantes d'un état antiviral dépendant de l'induction d'interférons de type I (IFN α et β) (Sen, 2001; Katze et al., 2002). Cet état résulte de la reconnaissance par des récepteurs cellulaires spécifiques de modèles moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui va initier des signaux qui induisent à terme l'expression de gènes effecteurs antiviraux (Sen, 2001; Cook et al., 2004). Chez les virus à ARN et en particulier le VHC, les ARN simple-brin ou double-brin ainsi que les motifs polyuridine font office de PAMPs et sont

reconnus par le TLR3 à la surface cellulaire et par RIG-I à l'intérieur des cellules (Yoneyama et al., 2004; Li et al., 2005a; Sumpter et al., 2005). Elle conduit à l'activation de facteurs de transcription principalement l'IRF3 (Facteur 3 Régulateur d'Interféron) (Au et al., 1995; Lin et al., 1999) et NF- κ B (Facteur nucléaire kappa B) (Richmond, 2002) qui vont permettre la sécrétion de IFN- α/β par la cellule infectée. L'activation de NF- κ B induit aussi la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui vont amplifier la réponse inflammatoire et faciliter le recrutement des leucocytes pour agir de concert avec les IFN- α/β dans la défense de l'hôte contre le VHC (Tai et al., 2000). Ces IFN sécrétés se lient aux récepteurs d'IFN pour déclencher l'activation de la cascade Jak-STAT et entraîner l'induction des ISGs (gènes stimulés par les IFNs) qui sont les effecteurs de la réponse de l'hôte à l'infection virale (Der et al., 1998).

Pour se répliquer et se propager efficacement, les virus ont développé de nombreuses stratégies pour échapper aux défenses de l'hôte (Katze et al., 2002). Les stratégies d'échappement du VHC ciblent particulièrement les voies de signalisation des PAMPs. La protéase NS3/4A du VHC se fait l'antagoniste de l'activation de l'IRF-3 et de l'induction d'IFN- α/β par le blocage de la voie de signalisation RIG-I. Elle inhibe aussi la voie de signalisation induite par le TLR3 en clivant la protéine adaptatrice TRIF (Foy et al., 2005; Li et al., 2005b). Ainsi, la phosphorylation/activation de l'IRF3 induite par le virus et l'activation de NF- κ B sont bloquées (Gale and Foy, 2005). La probable importance de la réponse IFN dans le succès de la défense antivirale de l'hôte est confortée par des données *in vitro* sur l'interférence de protéines virales avec d'autres parties de la cascade qu'elle induit (Gale and Foy, 2005).

En dépit de ce faisceau d'éléments en faveur d'une stratégie élaborée par le virus pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, des études menées chez le chimpanzé montrent que la réponse immune intrahépatique lors d'une infection aiguë par le VHC présente toutes les caractéristiques d'une forte réponse IFN- α/β alors que le VHC se propage rapidement dans le foie après inoculation (Bigger et al., 2004; Rehermann and Nascimbeni, 2005). La réponse ISG est toutefois comparable chez les animaux qui ont guéri de l'infection et ceux qui ont développé une infection chronique (Bigger et al., 2004; Rehermann and Nascimbeni, 2005) suggérant que les variations dans l'issue de l'infection ne sont pas le résultat direct de cette réponse (ISG).

I.7.3.2 Réponses immunes cellulaires

I.7.3.2.1 Cellules T CD4⁺

On pense que les cellules T CD4⁺ ont une importance capitale pour l'efficacité des réponses immunes humorales et cellulaires contre le VHC (Elliot et al., 2006). Un échec dans la génération et le maintien de cellules T CD4⁺ fonctionnelles est une caractéristique de plusieurs infections virales persistantes (Shoukry et al., 2004). Le rôle crucial des cellules T CD4⁺ est confirmé par des études de déplétion chez le chimpanzé où la perte des cellules T CD4⁺ a résulté en une infection persistante (Grakoui et al., 2003). Il est aujourd'hui largement admis qu'une réponse cellulaire T CD4⁺ forte, multispécifique et précoce est associée à la clairance virale et à la guérison de la maladie, alors qu'une réponse faible et tardive est associée à une infection chronique (Chang et al., 2001; Day et al., 2002; Thimme et al., 2002; Pestka et al., 2007). Chez ceux qui guérissent de l'infection, ces réponses sont maintenues jusque 20 ans après (Takaki et al., 2000). Toutefois, en dépit de réponses cellulaires T CD4⁺ robustes et précoces, on note chez certains patients un rebond de la virémie et à terme la persistance de l'infection (Gerlach et al., 1999; Thimme et al., 2001; Thimme et al., 2002). Thimme *et al.* (Thimme et al., 2002) ont montré que chez les patients qui développent une infection chronique, les réponses cellulaires T CD4⁺ ont été brièvement ou épisodiquement vigoureuses plutôt qu'absentes, indiquant qu'une réponse cellulaire T CD4⁺ massive doit être maintenue pour faciliter la résolution de l'infection.

Le large spectre de la réponse T CD4⁺ paraît aussi importante, puisque les réponses lymphoprolifératives contre une moyenne de 10 des 37 épitopes définis des protéines Core, NS3, NS4 et NS5 furent détectées chez ceux qui ont résolu l'infection, comparé aux réponses contre un épitope (ou moins) chez les patients avec une infection chronique (Day et al., 2002). Les protéines non structurales (NS3, NS4, NS5) et particulièrement NS3 étaient préférentiellement ciblées dans les infections spontanément résolues (Rosen et al., 2002; Schulze zur Wiesch et al., 2005). La présence de réponses cellulaires T contre un épitope immunodominant de NS3 (aa 1248-1261) avec une forte affinité de liaison pour une gamme d'allèles du HLA-DR pourrait être importante pour la clairance virale sans être absolument nécessaire puisque des individus non répondeurs ont aussi résolu l'infection en ciblant un autre épitope de NS3 (aa 1308-1407) (Diepolder et al., 1997). Une autre équipe décrit des réponses CD4 multiples contre des peptides de NS3 sans que l'un de ces épitopes ne soit particulièrement immunodominant (Wertheimer et al., 2003). Les modèles de production de cytokines de type T_H1 sont plus fréquents chez les individus qui ont spontanément résolu

l'infection, suggérant une association entre la production de cytokines antivirales telles que l'IFN γ et l'issue favorable de l'infection (Darling and Wright, 2004; Gramenzi et al., 2005). La faiblesse relative des réponses cellulaires T CD4⁺ observée dans l'infection chronique pourrait plus résulter d'une altération fonctionnelle que de l'absence ou de la déplétion de ces cellules. Il a été montré que la capacité des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ spécifiques du VHC à produire de l'IFN γ et à proliférer *in vitro* était altérée dans l'infection chronique quand elle était comparée à celle de patients ayant guéri spontanément (Ulsenheimer et al., 2003; Folgori et al., 2006). Semmo *et al.* ont aussi démontré une baisse de sécrétion d'IL-2 par les cellules T CD4⁺ dans l'infection chronique alors qu'elle était forte en cas de guérison spontanée (Semmo et al., 2005).

Les causes de l'échec apparent des réponses lymphocytaires T CD4⁺ dans l'infection chronique ne sont toujours pas bien connues. On tente actuellement de l'expliquer par l'épuisement ou l'anergie, voire par l'association de ces deux raisons. L'épuisement pourrait résulter de la forte capacité du virus à répliquer qui finit par déborder les capacités de la réponse immunitaire, résultant en une stimulation excessive des lymphocytes T qui ne peuvent être activés (Fuller et al., 2005). Thimme *et al.* (Thimme et al., 2002) ont noté que le VHC se propage si rapidement chez les chimpanzés infectés expérimentalement qu'il paraît outrepasser l'immunité de l'hôte, avec des réponses détectables seulement 4 à 8 semaines après le début de la virémie. L'anergie, ou inactivation fonctionnelle, pourrait résulter du maintien de fortes concentrations d'antigènes que le système immunitaire finit par tolérer (Brooks et al., 2005). Des éléments récents ont aussi impliqué les cellules T régulatrices (T_{REG}) dans la suppression fonctionnelle des réponses CD4⁺ par le VHC (Sugimoto et al., 2003a). En effet, la fréquence et l'activité des T_{REG} chez les infectés chroniques qui présentaient des lymphocytes T CD4⁺ inactifs est significativement plus importante qu'en cas de guérison spontanée. De plus, il a été montré que la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β , qui toutes deux sont caractéristiques des T_{REG}, est prédominante dans l'infection chronique par le VHC (Ulsenheimer et al., 2003). Enfin, une étude récente sur l'infection aiguë par le VHC chez le chimpanzé a démontré que la fréquence et l'activité suppressive des lymphocytes TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ était prédictive de l'établissement d'une infection chronique (Manigold et al., 2006).

I.7.3.2.2 Cellules T CD8⁺

Les fonctions effectrices des cellules T CD8⁺ incluent la destruction des cellules cibles (cytotoxicité) et la sécrétion non cytolytique de cytokines antivirales telles que l'IFN γ et le

TNF α (Neumann-Haefelin et al., 2005). Comme pour les réponses lymphocytaires T CD4⁺, une réponse T CD8⁺ forte, multispécifique et précoce est associée à la clairance virale (Cooper et al., 1999; Cucchiaroni et al., 2000; Gruner et al., 2000; Lechner et al., 2000b; Lauer et al., 2004). Des réponses T CD8⁺ ciblant plusieurs épitopes de la polyprotéine du VHC ont été observées chez les chimpanzés qui guérissaient spontanément alors qu'elles étaient faibles chez les animaux dont l'infection devenait chronique (Cooper et al., 1999). Cox *et al.* ont montré dans l'infection chronique une perte de la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à reconnaître certains épitopes antérieurement reconnus au cours de l'infection primaire (suggérant l'émergence de mutants d'échappement) et entraînant une réduction d'environ 85% de l'amplitude de la réponse immune (Cox et al., 2005). Par ailleurs, aucune capacité à reconnaître d'autres épitopes ne fut développée pendant l'infection persistante (Cox et al., 2005).

Les données sur le maintien de réponses cellulaires T CD8⁺ spécifiques du VHC après guérison sont contradictoires, il a été montré qu'elles pouvaient persister jusqu'à plusieurs décades (Lechner et al., 2000b; Takaki et al., 2000). Une autre étude a montré que les cellules T CD8⁺ persistent chez les patients infectés chroniques mais pas en cas de guérison spontanée, suggérant que la virémie est importante pour le maintien des réponses lymphocytaires T CD8⁺ (Chang et al., 2001). La persistance de cellules T mémoire CD4⁺ et CD8⁺ en l'absence d'antigènes observée dans les modèles animaux (Lau et al., 1994; Mullbacher, 1994; Veiga-Fernandes et al., 2000) n'est pas forcément retrouvée chez l'homme (Zinkernagel, 2002). Des variants du VHC au tropisme altéré peuvent être retenus dans des cellules hépatiques non hépatocytaires, dans les cellules dendritiques des nodules lymphatiques, dans les cellules mononuclées du sang périphérique ou même dans des sanctuaires comme le cerveau (Zinkernagel et al., 1996; Bronowicki et al., 1998; Sansonno et al., 1998; Crovatto et al., 2000; Laskus et al., 2002a; Radkowski et al., 2002; Laporte et al., 2003; Forton et al., 2004b). Des travaux récents sur des sujets qui ont guéri de l'infection mais dont les cellules mononuclées du sang périphérique contiennent de faibles quantités de virus suggèrent une exposition antigénique constante sans manifestations d'hépatite chronique (Pham et al., 2004; Radkowski et al., 2005; Gerotto et al., 2006).

A l'aide de tétramères HLA de classe I, il a été montré que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VHC sont plus souvent retrouvées dans le foie que dans le sang périphérique (Grabowska et al., 2001) et chez les patients ayant guéri de l'infection aiguë que chez ceux qui passent à la chronicité (Lechner et al., 2000b; Lauer et al., 2004). L'échec de la réponse lymphocytaire T

semble plus résulter d'une altération fonctionnelle que d'une déplétion (Lechner et al., 2000a; Gruener et al., 2001). En ce sens, il a été montré une altération de la production d'IFN γ et de TNF α chez les patients dont l'infection aiguë passait à la chronicité (Gruener et al., 2001; Wedemeyer et al., 2002; Spangenberg et al., 2005). Ce dysfonctionnement de la cellule T CD8⁺ est spécifique du VHC puisque des cellules T CD8⁺ spécifiques du virus influenza continuent de sécréter de l'IFN γ chez des patients infectés chroniquement par le VHC (Spangenberg et al., 2005). Des travaux indiquent que la cascade déclenchée par l'interaction PD-1 (Programmed Cell Death), un régulateur des cellules T, avec son ligand PD-L1 est un facteur clé dans l'épuisement des cellules T compte tenu de la production caractérisée de fortes quantités de cette protéine par les lymphocytes épuisés (Barber et al., 2006). A contrario, l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (CD127) est la signature d'une fraction de lymphocytes T CD8⁺ activés (Fuller et al., 2005).

Les raisons de la persistance du VHC en dépit d'une vigoureuse réponse lymphocytaire T CD8⁺ sont inconnues, néanmoins on pense que l'émergence de mutants viraux d'échappement résultant de la forte activité répliquative dépourvue de correction de l'ARN polymérase du virus joue un rôle majeur. Ericksson *et al.* ont mis en évidence la mutation de multiples épitopes HLA de classe I mais pas d'épitopes non restreints ou de régions flanquantes du génome viral au cours des premiers mois de l'infection chronique chez le chimpanzé (Erickson et al., 2001). L'analyse intensive des réponses cellulaires T CD8⁺ dans une cohorte de sujets HLA-B27⁺ guéris ou infectés chroniques a permis l'identification d'un épitope restreint par HLA-B27 qui est reconnu par la majorité des sujets ayant résolu l'infection (Neumann-Haefelin et al., 2006). Chez les patients ou sujets infectés chroniques, l'analyse de la séquence virale correspondante a montré une forte association entre les variations de séquence dans l'épitope et l'expression du HLA-B27, indiquant une pression de sélection spécifique de l'allèle dans la population. L'analyse fonctionnelle a montré que les épitopes des variants viraux émergents représentaient les mutations d'échappement. Il a été montré que les réponses lymphocytaires T CD8⁺ ciblant ces mutants d'échappement chez le chimpanzé diminuaient la diversité du récepteur de la cellule T (TCR) quand on la comparait aux réponses dirigées contre des épitopes sans variation (Meyer-Olson et al., 2004). La région hautement variable CDR3 du TCR contient un motif aa hautement conservé dans le site de reconnaissance de l'antigène dans trois des quatre réponses détectées dans le foie et le sang périphérique (Meyer-Olson et al., 2004). Cette diversité limitée du récepteur de la cellule T était présente avant que les mutants d'échappement viral ne soient détectés, ce qui peut

indiquer qu'un faible répertoire du TCR facilite l'émergence de mutants d'échappement et donc l'infection persistante.

I.7.3.2.3 Cellules T mémoire

Les réponses lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ mémoire jouent un rôle important dans la clairance virale en cas de réinfection. Les humains et les chimpanzés qui ont guéri de l'infection primaire montrent une protection accrue contre l'infection persistante en cas de réinfection avec une virémie de pic et de durée significativement diminués ainsi qu'une réduction d'incidence de l'infection chronique (Bassett et al., 2001; Mehta et al., 2002). La déplétion des cellules T CD8⁺ mémoire avant la réinfection entraîne chez le chimpanzé une prolongation de la virémie qui ne s'abaisse pas avant le début de la réapparition de ce sous-groupe lymphocytaire dans le foie en dépit de l'amorçage d'une réponse T CD4⁺ mémoire (Shoukry et al., 2003). La déplétion des cellules T CD4⁺ avant la réinfection a montré une persistance de la virémie de plus de 300 jours même si les niveaux sont plus faibles que celles observées lors de l'infection primaire (Grakoui et al., 2003). Cette étude montre aussi que cette déplétion conduit à l'émergence de mutants viraux d'échappement de classe I qui peut être le résultat d'un débordement des T CD8⁺ mémoire (Grakoui et al., 2003). La disparition de la virémie dans ces études de réinfection de chimpanzés a été associée à l'expansion de cellules T mémoire dans le sang (Nascimbeni et al., 2003; Shoukry et al., 2003), avec une préférence pour les épitopes non structuraux (Bassett et al., 2001). Même s'il faut rester prudent dans l'extrapolation de ces résultats à l'homme en raison de la haute fréquence de guérisons spontanées chez le chimpanzé (Major et al., 2002), ces données suggèrent que quoiqu'un niveau intermédiaire d'activité antivirale soit observé en cas de déplétion d'un de ces sous-groupes lymphocytaires mémoire, la clairance virale requiert leur présence concomitante. Cette hypothèse est confortée par une étude récente chez des sujets ayant guéri ou non de leur hépatite primaire qui montre que très tôt au cours de l'infection, la résolution est associée à des réponses T CD4⁺ précoces, fortes, multispécifiques et de type T_H1 tandis que le passage à la chronicité est caractérisé par la faiblesse et la lenteur des réponses. Toutefois, le contrôle de l'infection est aussi associé à la maturation des réponses mémoires effectrices soutenue par l'expansion progressive de cellules CD127⁺CD8⁺ (Urbani et al., 2006a), contrairement au phénotype d'épuisement de la cellule T CD8 avec une expression accrue de PD1 observé dans la chronicité (Urbani et al., 2006b).

I.7.3.3 Réponses immunes humorales

Les anticorps jouent généralement un rôle pivot dans la défense de l'hôte contre les pathogènes dans l'espace extracellulaire avec des mécanismes effecteurs dans la clairance virale comprenant neutralisation, activation du complément, opsonisation et cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps. Un nombre croissant d'études s'intéresse au rôle des réponses anticorps contre le VHC dans la clairance virale (Zeisel et al., 2007a). Néanmoins, la résolution de l'infection primaire ne corrèle pas avec les titres d'anticorps anti-VHC ou dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Chapel et al., 2001; Razvi et al., 2001). Les anticorps spécifiques du VHC sont détectables avec les tests de 3^{ème} génération en moyenne 23 j (entre 7 et 72) après la détection de la virémie (Peterson et al., 2000) ou 39 j (entre 23 et 72) après exposition. Ces anticorps restent détectables pendant tout le cours de l'infection chronique. En cas de guérison, ils décroissent graduellement avec un taux de séroréversion de 7 à 42% en 7 à 25 ans (Rodger et al., 2000; Takaki et al., 2000; Seeff et al., 2001).

La réponse immunitaire humorale dans l'infection primaire par le VHC à l'exception des réponses contre Core est faible et retardée (Chen et al., 1999). Elle est généralement restreinte aux anticorps de la sous-classe IgG1 sans la substitution par les sous-classes IgG3 (ou IgG4) habituellement observée dans la maturation de la réponse immunitaire antivirale (Chen et al., 1999). La clairance virale paraît associée à l'apparition d'anticorps IgG2; puisque les IgG2 contre Core et NS3 sont plus fréquemment retrouvés dans les cas de guérison que dans les cas de passage à la chronicité (Taura et al., 1995; Zein et al., 1999). De même, le ratio d'IgG2 et d'IgG1 dirigés contre Core et NS5 est supérieur à 1.0 en cas de résolution de l'infection alors qu'il était inférieur à 1 pour tous les antigènes en cas de persistance (Zein et al., 1999).

La présence d'anticorps neutralisants a été documentée chez les humains et les chimpanzés infectés par le VHC. On observe généralement des réponses tardives dans l'infection primaire et pas de réactivité croisée avec les virus hétérologues. La neutralisation de l'infectivité médiée par les anticorps a été démontrée *in vitro* pour des souches homologues chez le chimpanzé (Farci et al., 1994). Il a été démontré que les anticorps neutralisants ciblaient la région hypervariable (HVR)-1 de E2 et que des mutations dans cette région étaient associées à l'émergence de quasiespèces d'échappement à la neutralisation (Shimizu et al., 1994; Farci et al., 1996). Cette région du génome subit une forte proportion de substitutions nucléotidiques lors l'infection aiguë (Yamaguchi et al., 1994), impliquant que les anticorps neutralisants

exercer une pression de sélection significative sur les quasiespèces et traduisant l'importance de ce volet de la réponse humorale dans la clairance virale.

En dépit de l'évidence du rôle de ces anticorps, la proportion d'individus souffrant d'hypogammaglobulinémie qui élimine le virus est la même que dans la population générale (Bjoro et al., 1994). De plus, des études utilisant les VHCpp et les VHC-LP n'ont pas établi de rapport avec la clairance virale (Logvinoff et al., 2004; Steinmann et al., 2004). Néanmoins, des anticorps neutralisants IgM spécifiques de souche ont été décrits au moment de la séroconversion chez des patients qui n'ont pu contrôler l'infection alors que des anticorps capables de neutraliser des pseudotypes autologues (spécifiques de l'hôte) et hétérologues (autres souches et génotypes absents chez l'hôte) ont été retrouvés dans la résolution de l'infection aiguë (Logvinoff et al., 2004). Récemment, il a été montré que les anticorps neutralisants étaient capables d'empêcher la réplication virale dans des systèmes de culture *in vitro* (Yi et al., 2006) et de moduler *in vivo* l'infection du VHC (Eren et al., 2006).

I.7.3.4 Polymorphismes des gènes de l'hôte

L'issue de l'infection primaire par le VHC est probablement influencée par des facteurs génétiques qui déterminent les réponses immunitaires innée et adaptative contre le virus. Des différences raciales dans la capacité à guérir de l'infection ont été observées dans des études menées aux USA avec une plus grande clairance du virus chez les héroïnomanes blancs que chez leurs acolytes noirs (Villano et al., 1999). Une étude réalisée aux USA n'a pu établir une association indépendante entre la race et l'évidence sérologique de l'infection par le VHC qui aurait indiqué une différence de susceptibilité. Par contre, elle a trouvé une plus forte prévalence dans la persistance de la virémie chez les noirs non hispaniques que chez les blancs non hispaniques ou chez les Mexicains Américains (86 vs 67 vs 74%) (Alter et al., 1999). Un groupe a démontré une production réduite d'IFN γ dans l'infection primaire chez les Africains Américains, suggérant un mécanisme possible pour les différences dans l'issue de la maladie (Sugimoto et al., 2003b).

Les IFNs de type I induisent l'expression de nombreuses protéines présentant des activités antivirales telles que la protéine codée par le gène Myxovirus resistance 1 (MxA), la 2'-5' oligo-adenylate synthetase 1 (OAS-1) et la protéine kinase dépendante de l'ARN double-brin (db) (PKR) (Sen, 2001; Katze et al., 2002). Il a été montré que les niveaux d'ARN et de protéines MxA chez les patients VHC positifs traités à l'IFN sont plus élevés chez les répondeurs au traitement (Antonelli et al., 1999; Fernandez et al., 1999). Un polymorphisme à

nucléotide unique (SNP) à la position 88 dans le gène MxA qui réduit l'activité transcriptionnelle a été associé à l'infection chronique par le VHC (Knapp et al., 2003b).

Après liaison à l'ARN double-brin, l'OAS-1 catalyse la formation de 2'-5'-oligoadénylates et active la RNase L qui scinde les ARN cellulaires et viraux (Sen, 2001; Katze et al., 2002). Un SNP dans la région 3' non traduite du gène de l'OAS-1 a aussi été associé avec la clairance virale dans l'infection primaire (Knapp et al., 2003b). La PKR est activée par l'ARN db viral conduisant à la phosphorylation et à l'inactivation de son substrat, eIF2, avec à terme le blocage de la réplication du VHC (Sen, 2001; Katze et al., 2002). Il a été proposé que les interactions entre la protéine virale NS5A et la PKR étaient responsables de l'échec du traitement de l'hépatite par l'IFN (Gale et al., 1997). Des associations ont aussi été rapportées entre d'une part un polymorphisme dans la région promotrice de la PKR et l'autocontrôle de l'infection (Knapp et al., 2003b) et d'autre part des haplotypes du gène de l'Oxyde Nitrique Synthétase inductible (iNOS) et la clairance virale (Yee et al., 2004). La cytokine immunosuppressive IL-10 a des SNP localisés dans sa région promotrice. L'allèle AA à la position -592 est associé à la clairance virale du VHC alors que l'allèle GG à la position -1082 est associé à l'infection chronique. On pense que ces variants sont fonctionnels et représentent respectivement des génotypes de production faible ou forte d'IL-10 (Knapp et al., 2003a; Mangia et al., 2004; Oleksyk et al., 2005). Une autre étude a criblé 269 SNP dans les gènes candidats de la réponse de l'hôte chez 238 japonais ayant une sérologie positive pour le VHC et a trouvé des associations avec la clairance virale dans 20 gènes dont l'IL-4 et NFκB-1 (Saito et al., 2004). Ces résultats attendent confirmation par des études avec des cohortes indépendantes et vérification de la signification fonctionnelle des variants génotypiques (Minton et al., 2005). En revanche, il n'a pas été trouvé de variants des gènes codant le TGF-β, l'IFN-γ et TNF-α pouvant influencer sur la clairance virale (Barrett et al., 2003).

Plusieurs associations ont été faites entre la clairance du virus et les gènes HLA hautement polymorphiques. Beaucoup d'études sont limitées par des groupes de comparaison inappropriés qui ne sont pas assortis au comportement à risque (ex: transfusion sanguine) ou au groupe ethnique –Deux éléments clés dans les études d'association de maladie (Aikawa et al., 1996; Congia et al., 1996; Tibbs et al., 1996; Alric et al., 1997; Hohler et al., 1997; Cramp et al., 1998; Kuzushita et al., 1998; Minton et al., 1998; Zavaglia et al., 1998; Barrett et al., 1999; Lechmann et al., 1999; Mangia et al., 1999; Thursz et al., 1999; Alric et al., 2000; Fanning et al., 2000; McKiernan et al., 2000; Vejbaesya et al., 2000; Wawrzynowicz-Syczewska et al., 2000; Barrett et al., 2001; Thio et al., 2001; Thio et al., 2002; Fanning et al.,

2004; Khakoo et al., 2004). L'association la plus commune avec la clairance spontanée de l'infection a été faite avec les allèles de classe II, DQB1*0301 et DRB1*1101. Yee a entrepris une méta-analyse d'études publiées et sous réserve du biais de certains travaux, a trouvé que deux allèles étaient associés à la clairance virale (Yee, 2004). DRB1*1101 et DQB1*301 sont dans un rapport étroit de déséquilibre de sorte qu'un autre gène proche du locus HLA de classe II pourrait être réellement associé à la clairance virale. Toutefois, on a des preuves expérimentales que les épitopes immunodominants sont présentés par DRB1*1101 (Diepolder et al., 1997) et que les lignées cellulaires T reconnaissent les peptides du VHC présentés par DQB1*301 (Lamonaca et al., 1999).

A contrario, très peu d'associations ont été rapportées entre des allèles HLA de classe I et la résolution spontanée de l'infection primaire. Deux groupes ont démontré une association entre la persistance du virus et la présence du HLA Cw*04 (Thio et al., 2002; Fanning et al., 2004). Un mécanisme potentiel pour expliquer l'association des allèles HLA C avec la persistance a été élucidé suite à la description de l'interaction entre les allèles HLA de classe I et les récepteurs inhibiteurs des cellules NK (Khakoo et al., 2004). De même, HLA B27 a récemment été associé avec la clairance virale et les épitopes de la cellule T CD8⁺ restreints par HLA B27 à des cibles pour l'échappement viral (Neumann-Haefelin et al., 2006).

I.7.3.5 Cibles extra-hépatiques

Les hépatocytes sont considérés comme la cible privilégiée de la réplication virale. Cependant, il est aujourd'hui établi que le VHC est capable de se répliquer dans d'autres cellules de l'organisme notamment dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Bouffard et al., 1992; Wang et al., 1992). D'autres études ont montré que certaines sous-populations lymphocytaires B (Lerat et al., 1998; Roque Afonso et al., 1999) mais aussi les cellules dendritiques (Bain and Inchauspe, 2001; Navas et al., 2002), des lignées cellulaires d'origine hépatique ou lymphoïde (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1993) et même des cellules épithéliales intestinales (Deforges et al., 2004) ou des cellules du SNC (Radkowski et al., 2002; Forton et al., 2004a) sont permissives au VHC. L'existence de ces sites extra-hépatiques de réplication du virus pourrait expliquer en partie la réinfection rapide du greffon observée en cas de transplantation hépatique (Laskus et al., 2002b).

Les paramètres déterminant le tropisme cellulaire du virus semblent multiples. La variabilité au sein des protéines d'enveloppe, en particulier dans la région HVR1 de la protéine E2, et entre les variants isolés dans différents compartiments de l'organisme suggèrent que leur

reconnaissance dépend de molécules de surface cellulaire spécifiques du type cellulaire. Mais le tropisme peut aussi être influencé par une éventuelle déficience des mécanismes essentiels du cycle viral, dont la réplication, l'assemblage et la sécrétion.

I.8 LE TRAITEMENT

I.8.1 Les thérapies actuelles

En l'absence d'un vaccin efficace contre le VHC, la thérapie actuelle pour traiter l'infection chronique est l'interféron α pegylé en combinaison avec la ribavirine (Hugle and Cerny, 2003). Les interférons sont des glycoprotéines naturelles qui possèdent des propriétés antivirales et immunomodulatrices (Tan et al., 2002). Elles sont produites par l'organisme humain en présence d'une infection virale. Elles inhibent la réplication virale par phosphorylation du facteur d'initiation de la synthèse protéique eIF2 après son activation par phosphorylation de molécules intervenant dans la transduction du signal telles que STAT1 et STAT2. L'inhibition de la synthèse protéique par l'activation de eIF2 altère l'initiation de la traduction de protéines virales. De plus, l'IFN stimule le système immunitaire qui promeut l'élimination du virus infectant.

On utilise l'IFN pegylé ie une forme associée à une molécule de 12-40 kDa de polyethylene glycol caractérisée par une longue demi-vie, des effets secondaires limités et une plus grande efficacité (Thomson and Finch, 2005). La ribavirine est un analogue synthétique de la guanosine administré oralement qui agit par inhibition de l'inosine monophosphate déshydrogenase (IMPDH), une enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse de GTP (Tan et al., 2002) entraînant une diminution des niveaux intracellulaires de GTP et qui bloque indirectement la réplication de l'ARN viral. La ribavirine est de plus capable d'inhiber directement la polymérase NS5B suite à l'incorporation de RMP dans le site catalytique.

Une réponse virologique prolongée, définie comme le maintien de niveaux normaux d'ALT associé à une virémie négative six mois après la fin du traitement, est obtenue chez 50% des patients traités par cette bithérapie avec ~40% chez les patients infectés par le génotype 1 et 80% chez les porteurs des génotypes 2 et 3 (Tan et al., 2002). La décision de traitement est complexe et déterminée en fonction de l'état clinique de chaque patient (Papatheodoridis and Cholongitas, 2004).

I.8.2 Thérapies émergentes et cibles antivirales

Les effets secondaires sévères, la faible efficacité contre le génotype 1 et le nombre important de contre-indications ont rendu indispensable la mise au point de thérapeutiques plus efficaces (Hugle and Cerny, 2003). Des voies potentielles d'investigation sont l'amélioration de la biodisponibilité de l'IFN et l'optimisation de sa pharmacocinétique. La conjugaison à l'albumine, l'encapsulation dans des liposomes, les interférons alternatifs font l'objet d'intenses d'investigations (Pockros, 2002). De même, des inhibiteurs de l'IMPDH avec des effets secondaires moindres que la ribavirine qui puissent provoquer une déplétion efficace du GTP cellulaire et induire des activités antivirale et anti-inflammatoire sont à l'étude. C'est le cas de la levovirine, un L-énantiomère de la ribavirine qui est excrétée sous une forme non phosphorylée dans les urines. Elle ne provoque pas d'anémie hémolytique et module la balance Th1/Th2 qui stimule la prolifération cellulaire T spécifique du VHC (Lin et al., 2003).

Les progrès récents dans la culture cellulaire du VHC, le modèle chimpanzé, les petits modèles animaux ainsi que la disponibilité des structures tridimensionnelles de plusieurs enzymes virales devraient favoriser la mise au point d'agents antiviraux ciblant des étapes essentielles du cycle viral dont l'initiation de la traduction, la maturation de la polyprotéine par les protéases NS2/3 et NS3 et la réplication de l'ARN par NS5B. Ils ont permis l'émergence d'un nouveau concept: STAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV) dans la lutte contre le VHC (Parfieniuk et al., 2007; Sulkowski, 2007). Ainsi, plusieurs molécules et inhibiteurs de petite taille ciblant les sites catalytique et allostérique du virus font l'objet d'essais cliniques. On peut citer SCH 503034, un inhibiteur spécifique du site actif de NS3 (Malcolm et al., 2006) ou encore ITMN 191, un inhibiteur de la protéase NS3/4A (He et al., 2008). Des inhibiteurs de l'ARN polymérase virale sont en cours de développement parmi lesquels la valopicitabine et R1626, des analogues nucléosidiques (Toniutto et al., 2007; Roberts et al., 2008) et HCV 796 un analogue non nucléosidique (Le Pogam et al., 2008) qui sont en phase d'études cliniques.

L'utilisation de ribozymes modifiées chimiquement pour dégrader des régions très conservées du génome viral (Jarczak et al., 2005; Gonzalez-Carmona et al., 2006) a été explorée avec des résultats mitigés du fait d'une toxicité chez l'animal (2000). Par ailleurs, de petits oligodéoxynucléotides complémentaires à des séquences d'ARN viral ont été générés pour inhiber l'expression des protéines virales et cellulaires (Randall and Rice, 2004; Prabhu et al., 2006; Lupberger et al., 2008).

Le potentiel des immunomodulateurs a fait l'objet d'investigations, seuls ou en association avec l'IFN (Hugle and Cerny, 2003). Ils peuvent être utilisés pour empêcher les dommages hépatiques et pour booster la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus. L'un de ces immunomodulateurs prometteur est l'isatoribine (ANA975), un agoniste TLR7 qui a démontré une puissante immunogénicité in vitro et in vivo et qui est efficace contre les génotypes 1 et 3 (Xiang et al., 2007). L'actilon (CPG 1010101), un agoniste TLR9 stimule le système immunitaire, induisant la sécrétion de cytokines et de chimiokines antivirales et activant les cellules NK, T, pDC, NKT et B. Il aurait une action synergique avec l'IFN pegylé + ribavirine et serait bien toléré (McHutchison et al., 2007; Vicari et al., 2007).

Des candidats vaccins sont à l'étude. On peut citer le GI 5005 (Haller et al., 2007), le TG4040 et le XTL6865 [AASLD 2005] qui font l'objet d'essais cliniques de phase I.

II OBJECTIFS DE LA THESE

L'infection par le virus de l'hépatite C pose un problème majeur de santé publique. Environ 200 millions de personnes soit 3% de la population mondiale est touché par ce fléau avec dans la majorité des cas, une évolution vers la chronicité qui peut se compliquer par une cirrhose voire un hépatocarcinome. En France, ce cancer est devenu la première cause de transplantation hépatique. Une meilleure compréhension du cycle viral contribuerait grandement à la mise au point d'antiviraux efficaces, les thérapies actuelles ayant fait la preuve de leurs limites avec une efficacité chez seulement 50% des patients traités. Une des caractéristiques des virus à ARN de polarité positive est l'initiation de la synthèse de l'ARN à partir des extrémités 3' du génome par un mécanisme *de novo*. Dans le cas particulier du VHC, des travaux antérieurs de notre laboratoire portant sur la détermination de la structure secondaire des 342 nucléotides N-terminaux du brin (-) ont mis au jour 60% d'homologie de séquence nucléotidique entre les tiges-boucles SLEI et SLII des extrémités 3' respectives des brins (-) et (+) du génome (Schuster et al., 2002). Une telle similitude de séquence nous a fait supposer que la tige-boucle SLEI pourrait jouer un rôle dans le cycle viral comme déjà décrit pour la SLII (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003). Mon projet de thèse a consisté à rechercher des protéines virales ou cellulaires interagissant avec la tige-boucle SLEI et à déterminer leur implication dans le cycle viral. Pour ce faire, nous avons entrepris par la technique du triple-hybride dans la levure, d'une part le criblage d'une banque d'ADNc de foie humain, la tige-boucle SL-EI servant d'appât et d'autre part, la recherche d'une interaction avec les protéines virales. Nous avons isolé un interactant protéique: une forme tronquée de l'apolipoprotéine E (ApoE) humaine. Cette protéine a un rôle bien décrit dans le transport des lipides (Mahley and Rall, 2000) et est particulièrement intéressante du fait de la liaison entre le métabolisme lipidique et le cycle viral du VHC (Andre et al., 2005).

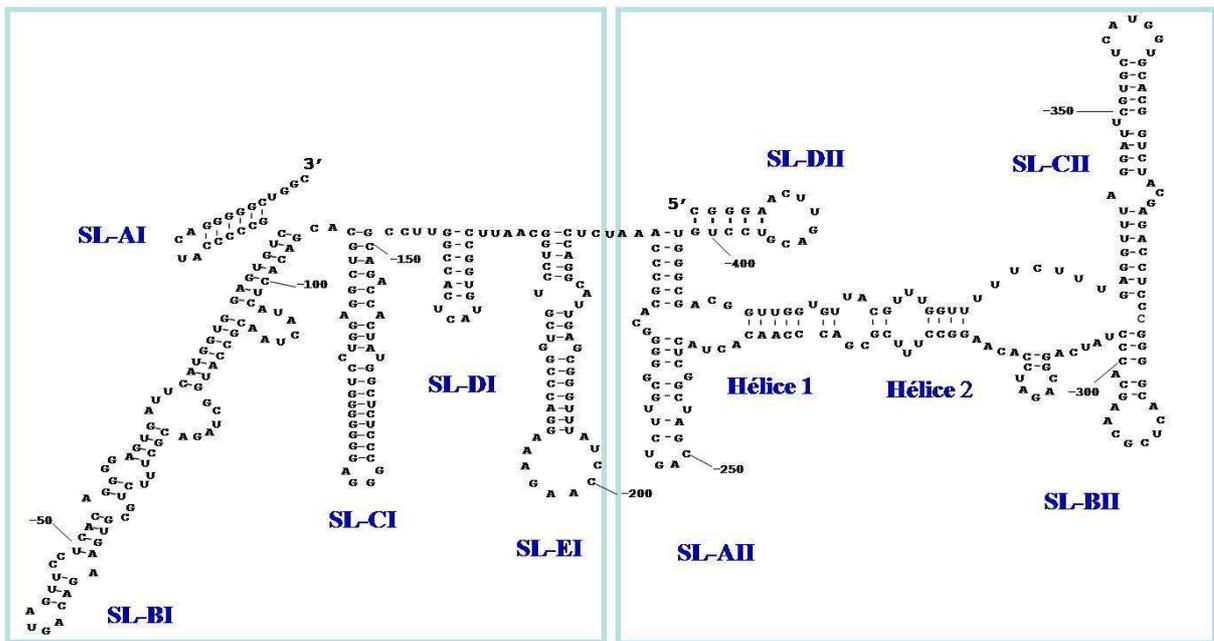
Dans un second temps, le rôle de cette protéine dans le cycle viral du VHC a été évalué au moyen du système de production de particules virales VHCcc (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005) et de petits ARNs interférents (siARNs) spécifiques. Ainsi, nous avons testé l'impact d'ApoE sur le mécanisme de répllication et la production de particules virales infectieuses. Par ailleurs, une interaction de notre candidat avec les protéines non structurales du virus a été investiguée par le système du double-hybride dans la levure puis confirmée par immunoprécipitation à partir de cellules Huh 7.5 répliquant Jc1.

III RESULTATS

III.1 Introduction

Les extrémités 3' des brins (+) et (-) du VHC contiennent des séquences essentielles pour la réplication de l'ARN. La capacité de ces extrémités à être répliquées ou à être reconnues par des protéines dépend du repliement adopté par l'ARN. Il est en effet important de connaître les nucléotides non appariés, formant les boucles de ces extrémités car ils sont généralement impliqués dans les interactions ARN/ARN ou ARN/protéines (Svoboda and Di Cara, 2006). L'extrémité 3'NTR du brin (+) est composée de 3 régions: une région variable, une séquence interne poly(U/UC) et, enfin la région X (Kolykhalov et al., 1996; Ito and Lai, 1997). (**Figure 4, page 20**). Plusieurs études ont montré que la région poly(U/UC) et la région X étaient essentielles à la réplication virale et à l'infectivité des virions du VHC (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003). La région X est directement impliquée dans la réplication de l'ARN viral. Elle est très conservée parmi les génotypes et est structurée en 3 tiges-boucles, appelées SL-I, SL-II et SL-III (Blight and Rice, 1997). Elle interagit spécifiquement avec la polymérase virale NS5B au niveau de la tige-boucle I et de la région simple brin reliant les tiges-boucles I et II (Oh et al., 2000). Cette région constituant l'extrémité 3'(+) du génome viral est reconnue par de nombreux facteurs cellulaires tels que la protéine ribosomale L22 (Wood et al., 2001) et la protéine PTB (Tsuchihara et al., 1997; Ito and Lai, 1999).

L'extrémité 3' du brin (-) sert de promoteur pour la synthèse de nouveaux génomes de polarité (+) (Oh et al., 1999). Du fait de l'absence d'une structure détaillée de cette extrémité, une étude a été entreprise dans notre laboratoire pour en déterminer le repliement secondaire en solution par la méthode de "probing". Cette méthode est basée sur l'utilisation de sondes chimiques et enzymatiques (Ehresmann et al., 1987) et est confirmée par les prédictions de repliement secondaire obtenues par le logiciel informatique RNA fold (<http://www.tbi.univie.ac.at/RNA/RNAfold.html>). Cette étude détaillée a permis de démontrer que l'extrémité 3'(-) est structurée en deux domaines, les domaines I et II (Schuster et al., 2002). Le domaine I comprend les nucléotides -1 à -230 au niveau desquels est certainement initiée la synthèse du brin (+). Ce domaine est replié en cinq structures stables de type tige-boucle, appelées SL-AI, SL-BI, SL-CI, SL-DI et SL-EI. Le domaine I est suivi d'une structure moins stable qui comprend les nucléotides -231 à -416, le domaine II. (**Figure 18**).



Domaine I

Domaine II

Figure 18: Représentation schématique de la structure des domaines I et II de l'extrémité 3' du brin (-) du VHC.

Dans l'optique de trouver des caractéristiques communes aux extrémités 3' des brins (-) et (+) du VHC, régions toutes deux impliquées dans le processus de réplication, leurs séquences ont été comparées et une homologie de 60% a été trouvée entre les tiges-boucles SL-EI et SL-II. (Figure 19). Il est connu que SL-II est impliquée dans l'interaction avec la protéine PTB (Ito and Lai, 1997). Cependant, les nucléotides de SL-II qui sont importants pour la fixation de PTB, ne sont pas ceux qui sont homologues entre SL-II et SL-EI. De même, il n'existe aucune homologie entre la séquence consensus de liaison de PTB au niveau de l'extrémité 3'(+) et la séquence 3' du brin (-). En accord avec cette observation, il a été montré que PTB ne peut se fixer que sur l'extrémité 3'(+) et non sur la région terminale 3'(-) du VHC (Tsuchihara et al., 1997). La similitude de séquence observée entre ces deux régions d'ARN présentant une fonction commune à savoir la réplication, suggère fortement qu'elle pouvait être la cible de facteurs protéiques impliqués dans le cycle viral.

Brin plus

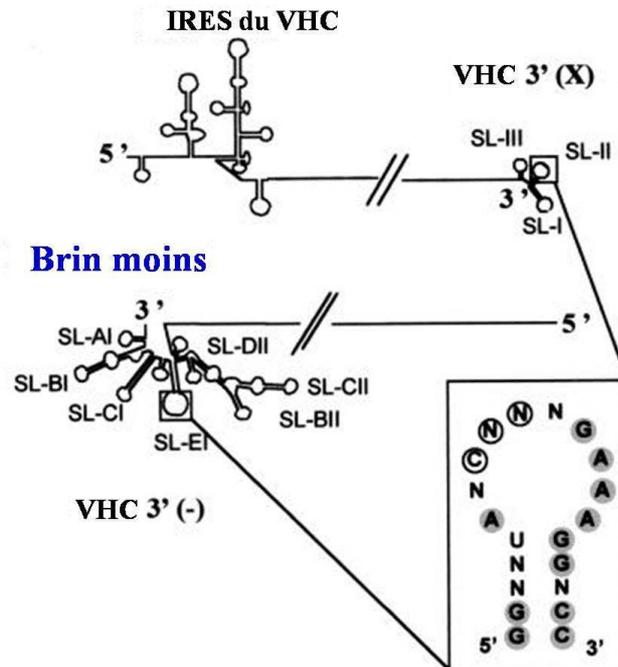


Figure 19: Représentation schématique des brins (-) et (+) du VHC.

Dans l'encadré, les nucléotides conservés entre SLII et SLEI sont ombrés. Les nucléotides intervenant dans la liaison par PTB sont entourés. Adapté de (Schuster et al., 2002).

Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de rechercher par un criblage de type triple-hybride dans la levure des protéines virales ou cellulaires capables de reconnaître SL-EI (nucléotides -212 à -231) et SLII (nucléotides 9630 à 9651) et de ce fait impliquées dans le cycle viral du VHC.

Le triple-hybride dans la levure permet l'étude d'interactions ARN-protéine *ex vivo*. Elle est basée sur l'expression dans la levure de trois molécules chimériques dont l'interaction aboutit à l'activation de deux gènes rapporteurs (SenGupta et al., 1996). Cette méthode utilise une protéine activatrice de la transcription dont les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et d'activation (AD) sont structurellement et fonctionnellement indépendants et interchangeables. Dans notre système, le DBD de LexA est exprimé en fusion avec MS2-Coat qui est une protéine de liaison à l'ARN MS2. La deuxième protéine de fusion est constituée d'une part par l'AD de Gal4 et d'autre part par la protéine Y de liaison à l'ARN que l'on souhaite étudier ou isoler. Ces deux protéines de fusion seront "pontées" par l'intermédiaire d'un troisième partenaire, à savoir une molécule d'ARN hybride qui contient les sites MS2,

spécifiquement reconnus par MS2-Coat, ainsi que la séquence d'ARN X (ARN d'intérêt, dans notre cas SLEI ou SLII WT ou mutés) qui elle, sera reconnue par la protéine Y de liaison à l'ARN que nous recherchons. L'interaction entre la protéine Y et l'ARN X va permettre la formation d'un activateur transcriptionnel fonctionnel qui induira l'expression de deux gènes rapporteurs, *HIS3* et *LacZ*. Il faut noter que la protéine de fusion LexA_{DBD}-MS2 est codée par le génome de la souche de levure YBZ1, alors que la protéine Y-Gal4_{AD} et l'ARN hybride MS2-X sont exprimés à partir de plasmides respectivement pACT2 et pIIIAMS2-2. (Cf. section Matériels et Méthodes, **Figure 37, page 127**).

Ainsi pour les besoins de notre étude, la tige-boucle SLEI a été clonée en fusion avec l'ARN MS2 dans le plasmide pIIIAMS2-2 (pIV 1310) et la levure YBZ1 a été transformée par cette construction. Un ARN dérivé de SLEI dans lequel les nucléotides communs entre les tiges-boucles SLEI et SLII ont été mutés, a été fusionné à MS2 afin de tester la spécificité de l'interaction observée. Le plasmide correspondant, pIV 1364 porte la tige-boucle SLEIRM et nous a servi de construction contrôle permettant la validation de la spécificité des interactions. De même, la tige-boucle SLII a été exprimée dans le contexte de l'ARN hybride pour tester son interaction avec d'éventuels candidats du crible. Le bon repliement de ces ARNs a été vérifié au moyen du programme bioinformatique RNA Fold.

III.2 Etude de la réplication de mutants de SLEI dans des lignées cellulaires dérivées d'hépatomes humains.

Dans le plasmide pJc1 qui code un génome du VHC produisant des virions infectieux en culture cellulaire (Pietschmann et al., 2006) (**Figure 35, page 119**), les nucléotides communs entre SLEI et SLII ont été mutés en nucléotides complémentaires (G↔C ou A↔U). On obtient alors SLEIRM (SLEI Reverse Mutant), SLIIRM ou SL2M (où les 2 tiges-boucles d'intérêt ont été simultanément mutés). Les plasmides pIV 1363, pIV 1369 et pIV 1371 respectivement ont ainsi été générés. Ces constructions plasmidiques ont été transcrites *in vitro* et les ARN viraux obtenus ont été transfectés par électroporation dans des cellules Huh7.5. Puis, la réplication de ces mutants a été testée dans les lysats cellulaires par RT-PCR à 48, 72 et 96 h. Nous avons noté que ces mutations sont délétères pour la réplication du virus. (**Figure 20**). Ce qui traduit l'importance fonctionnelle de ces régions et conforte l'intérêt de notre étude.

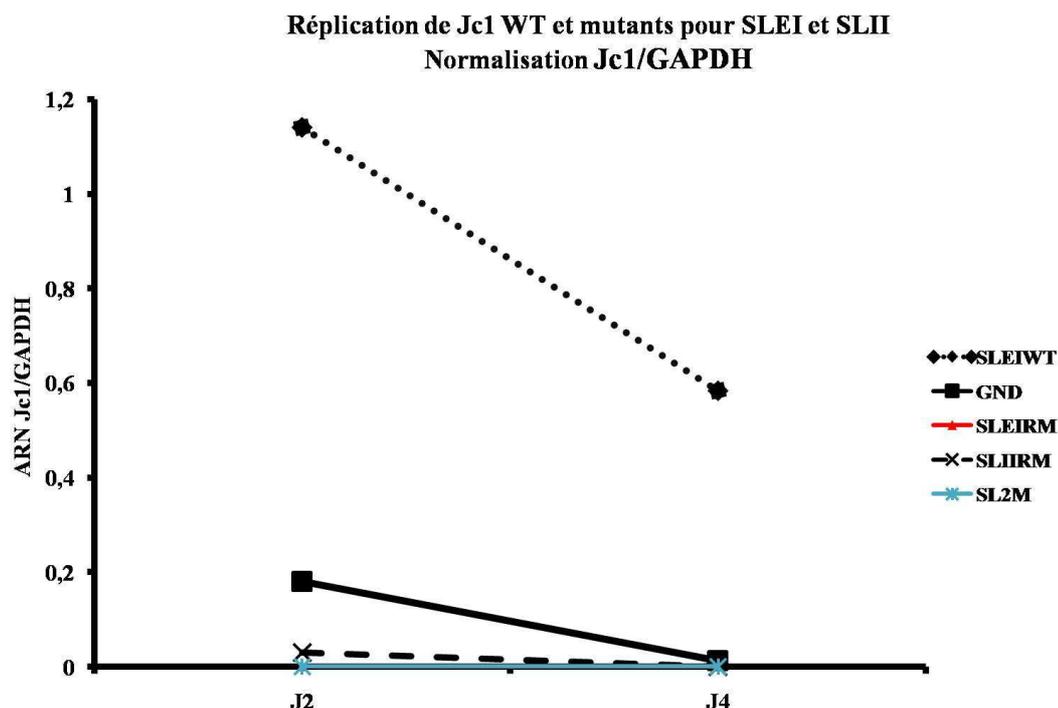


Figure 20: Etude de la réplication des mutants des tiges-boucles SLEI et SLII dans Jc1.

Des cellules Huh7.5 ont été électroporées avec l'ARN viral Jc1WT (SLEIWT) ou muté au niveau des tiges-boucles [SLEI (SLEIRM), SLII (SLIIRM), double-mutant (SL2M)] voire du site catalytique de NS5B-GND (GND). A J2 et J4 post-transfection, les ARN cellulaires totaux ont été récoltés. L'ARN du VHC a été quantifié par RT-PCR dans les lysats cellulaires et le nombre de molécules d'ARN viral a été normalisé par rapport à l'ARN de la GAPDH.

III.3 Recherche par triple-hybride d'interactants de SLEI et clones candidats.

Dans un premier temps, nous avons testé l'existence d'une interaction entre la tige-boucle SLEI et les protéines non structurales du VHC. Toutes les protéines non structurales du VHC ainsi que Core ont été clonées dans le vecteur pGADT7 (Clontech), en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 lors d'un précédent travail (Dimitrova et al., 2003). La souche de levure YBZ1 dont le génome code pour la protéine LexA_{DBD}-MS2 a été cotransformée par pIIIAMS2-2 permettant l'expression de l'ARN hybride SLEI-MS2 (pIV 1310) et par pGADT7-NS codant pour l'une des protéines du VHC en fusion avec Gal4 (Gal4_{AD}-NS). Seule la protéine NS5B qui est l'ARN polymérase ARN dépendante du virus, interagit avec la tige-boucle SLEI (**Figure 23, page 92**).

Dans un second temps, le plasmide pIV 1310 codant SLEI WT-MS2 transformé dans YBZ1 a été utilisé pour cribler une banque d'ADNc de foie humain préparée dans le vecteur pACT2 et

transformant la souche de levure Y187. Après 24h de croisement, les levures sont étalées sur un milieu hautement sélectif SD/-URA-LEU-HIS-ADE (QDO) + 5 mM de 3AT. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 8 à 21 j. Quelques 3×10^8 clones ont été criblés. 47 clones ont été sélectionnés et réétalés sur le même milieu. L'étape suivante de sélection a consisté à tester sur boîte l'expression du gène reporter *LacZ*. 42 clones ont été retenus et ont fait l'objet d'une extraction au phénol-chloroforme. Les préparations plasmidiques ont été électroporées dans des bactéries KC8 auxotrophes pour la leucine et étalées sur un substrat à base de milieu M9 minimum pour sélectionner pACT2. Les inserts ont ensuite été séquencés et analysés par comparaison aux bases de données du NCBI. Cinq clones candidats ont été identifiés: La Protéine 4 de Liaison au Rétinol (RBP4), une forme tronquée de l'Apolipoprotéine E (ApoE-C-term correspondant aux 10 aa C-terminaux suivis de la région 3' non traduite) et l'albumine (identifiée trois fois).

III.4 Caractérisation des interactions entre les clones candidats et la tige-boucle SLEI

Pour mieux caractériser les interactions entre SLEI et les protéines candidates, la souche YBZ1 a été cotransformée par les plasmides exprimant les différents clones candidats et d'une part la tige-boucle SLEIWT et d'autre part par SLEIRM (contrôle de la spécificité de l'interaction). Pour la pousse, les levures cotransformées ont été étalées sur un milieu sélectif SD/-URA-LEU-HIS-ADE (QDO) additionné de concentrations croissantes de 3AT (0 à 30 mM) qui est un inhibiteur de l'expression du rapporteur *HIS3*. En présence de 5 mM d'AT, l'interaction des tiges-boucles avec RBP4 et l'albumine était perdue alors qu'elle était maintenue pour les deux autres clones candidats à savoir ApoE et NS5B. (**Figure 21**).

	SLEIWT <i>Confirmation</i>	SLEIRM <i>Spécificité</i>
RBP	-	-
Serum Alb	-	-
Serum Alb	-	-
Serum Alb	-	-
Apo E	++	+/-
NS5B	+	+

SD/ULHA + 5mM de 3AT

Figure 21: Tableau récapitulatif de la pousse des interactants de SLEI (WT ou RM)

Nous avons conclu à des artefacts pour les deux premières. Les concentrations croissantes d'AT laissent entrevoir une importance des nucléotides communs entre SLEI et SLII dans l'interaction puisque les levures poussaient mieux en présence de SLEIWT que de SLEIRM.

La force et la spécificité des interactions étant corrélées (Hook et al., 2005), nous avons testé les forces relatives de nos différentes interactions par l'analyse de l'expression du second gène rapporteur *Lac Z* au moyen de l'activité β -galactosidase en milieu liquide. Celle-ci a révélé une forte interaction d'ApoE-Cterm pour SLEIWT, alors qu'elle était nulle pour le mutant. Ceci révélait une spécificité de cette protéine pour la tige-boucle d'intérêt.

La liaison de NS5B quant à elle était quasiment identique pour SLEIWT et pour SLEIRM. (Figure 22).

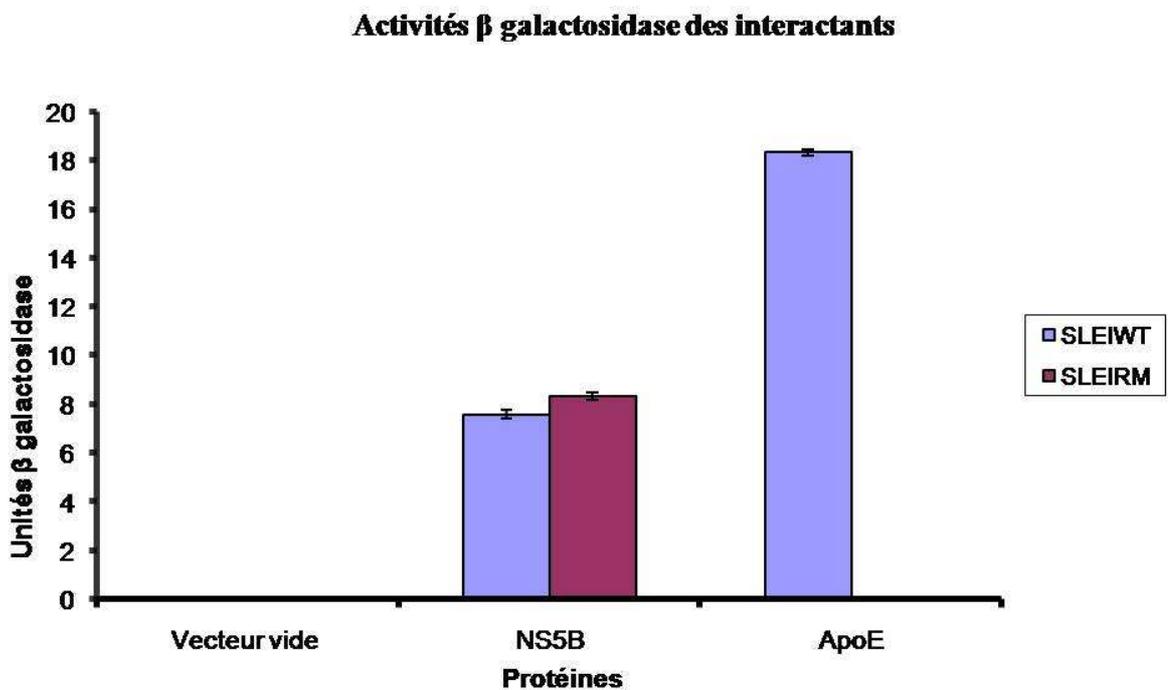


Figure 22: Le C-terminal d'ApoE interagit spécifiquement avec SLEI.
La souche de levure YBZ1 est co-transformée par le plasmide codant l'ARN SLEI (WT ou RM) et le plasmide codant les protéines d'intérêt (Gal4 AD, ApoE, NS5B). L'activation du gène *LacZ* est mesurée par le niveau d'activité β galactosidase / mg de protéine dans le milieu de culture. ApoE interagit spécifiquement avec SLEI. NS5B interagit non spécifiquement avec SLEI.

Par ailleurs, dans le but de vérifier notre hypothèse sur l'importance des nucléotides communs aux tiges-boucles SLEI et SLII, nous avons testé l'interaction de SLII en triple-hybride avec

le clone d'ApoE C-term isolé précédemment. Nous avons constaté que SLII interagit également spécifiquement avec la forme tronquée d'ApoE. (**Figure 23**).



Figure 23: Le C-term d'ApoE interagit spécifiquement avec SLEI et SLII.

La souche de levure YBZ1 est cointégrée par le plasmide codant les ARN SLEI (WT ou RM) ou SLII et le plasmide codant les protéines d'intérêt (ApoE C-term, NS5B) ou les protéines contrôles (Gal4AD ou Gal4AD-T). Des quantités équivalentes de levures (D0 0,7) sont ensemencées sur milieux sélectifs SD/ULHA + AT (30 mM). Après 20 j de croissance à 30°C, seules les levures coexprimant ApoE C-term et SLEIWT ou ApoE C-term et SLII ont poussé significativement.

Au vu de ces résultats, nous avons retenu la protéine ApoE comme un bon candidat pour étudier les interactions virus-hôte dans le cadre de l'infection par le VHC.

III.5 ApoE full-length n'interagit pas avec SLEI

Les résultats précédents ayant été obtenus avec une forme tronquée d'ApoE (seulement 10 derniers aminoacides exprimés), nous avons testé en triple-hybride l'interaction de la protéine entière (clone BC003557 obtenu de LGC Promochem France) avec la tige-boucle SLEI. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de pousse sur le milieu sélectif SD/ULHA + 3AT à 5 mM dans ces conditions. Ces résultats peuvent s'expliquer par un problème de structure de la protéine dans le contexte du triple-hybride dans la levure.

Compte tenu de l'importance croissante des lipoprotéines dans l'infection par le VHC (Andre et al., 2005; Chang et al., 2007; Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008), nous avons néanmoins investigué l'impact d'ApoE sur le cycle viral.

III.6 Etude de l'implication fonctionnelle d'ApoE dans le cycle viral

Pour déterminer le rôle d'ApoE dans l'infection par le VHC, nous avons choisi de bloquer l'expression de cette protéine par la technique de l'ARN interférent et d'analyser l'impact de cette déplétion sur différents aspects du cycle viral. En effet, l'ARN interférent permet transitoirement, l'inhibition sélective de l'expression de gènes cibles pour en déterminer la fonction. En ce sens, des cellules Huh7.5 ont été transfectées à la lipofectamine avec de petits ARNs interférents spécifiques (siARN) d'ApoE ou des siARNs contrôles (siCTRL1, siCTRL2 et siHCV331). Les siARNs CTRL1-2 et ApoE sont d'origine commerciale (Dharmacon). Le siARN HCV331 cible l'IRES du virus et bloque la traduction des protéines virales (Yokota et al., 2003). Après 72 heures de culture, l'inhibition de l'expression d'ApoE dans les cellules transfectées a été vérifiée par Immunoblot dans les lysats avec un anticorps spécifique. (**Figure 24**). L'expression d'ApoE dans les cellules transfectées est totalement inhibée dans ces conditions (colonne 3) comparée à celle de cellules non transfectées (colonnes 5 et 6) ou transfectées avec un siARN CTRL (colonnes 1, 2 et 4). L'expression de la β -actine dans les différents lysats cellulaires a été détectée en parallèle avec un anticorps spécifique.

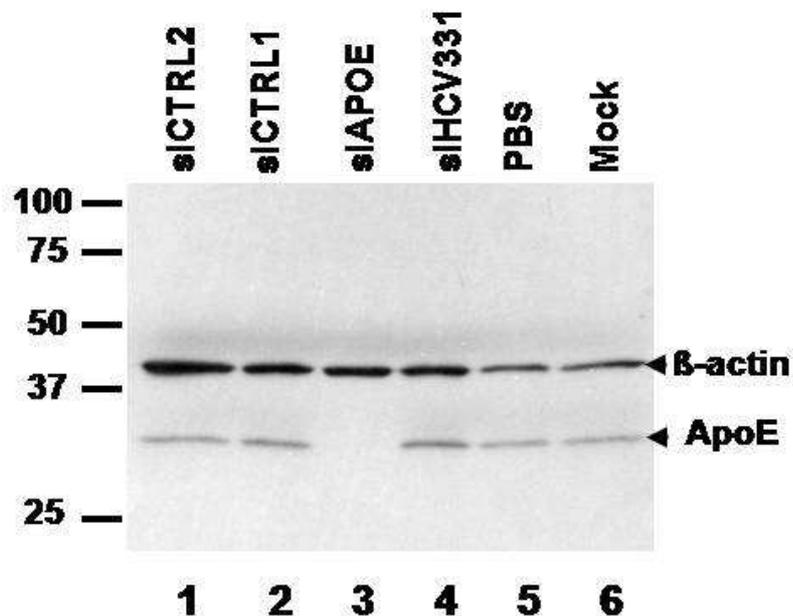


Figure 24: Analyse par Immunoblot de l'inhibition de l'expression d'ApoE par des ARN interférents spécifiques dans les cellules Huh7.5.

Des cellules Huh7.5 ont été transfectées avec des ARNs interférents contrôle (siCTRL1, siCTRL2 et siHCV331), spécifiques d'ApoE (siApoE) ou avec du PBS voire non transfectées (Mock). Après 72 heures de culture, les cellules ont été lysées et les extraits protéiques séparés par SDS-PAGE puis un immunoblot a été réalisé avec un anticorps anti-ApoE ou anti- β -actin.

III.6.1 L'inhibition de l'expression d'ApoE n'a pas d'impact sur la réplication de l'ARN viral Jc1-Luc.

Il est connu que la portion 3'X dans la région 3'NTR dont l'un des éléments est la tige-boucle SLII est requise pour l'infectivité du VHC (Waris et al., 2004) et sa réplication dans les cellules hôtes (Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003). La tige-boucle SLEI qui présente un haut niveau d'homologie avec SLII, interagit avec une forme tronquée d'ApoE un constituant essentiel des lipoprotéines plasmatiques humaines. Nous avons décidé d'analyser l'impact de notre protéine candidate sur la réplication de l'ARN viral par l'inhibition sélective de son expression. Dans cette optique, des cellules Huh7.5 ont été électroporées avec des siARNs contrôles ou spécifiques d'ApoE. Au bout de 72 heures, ces cellules ont été réélectroporées avec l'ARN viral Jc1-Luc (génome VHC infectieux codant un gène rapporteur luciférase) et collectées à 24, 48, 72 et 96 heures. La réplication de l'ARN génomique est quantifiée dans les lysats cellulaires par mesure de l'activité luciférase. (Figure 25). Les résultats montrent que l'inhibition de l'expression d'ApoE ne perturbe pas la réplication de l'ARN du VHC (comparer siApoE / siCTRL1 et 2). En revanche comme attendu, la réplication est fortement inhibée par le traitement au siHCV331.

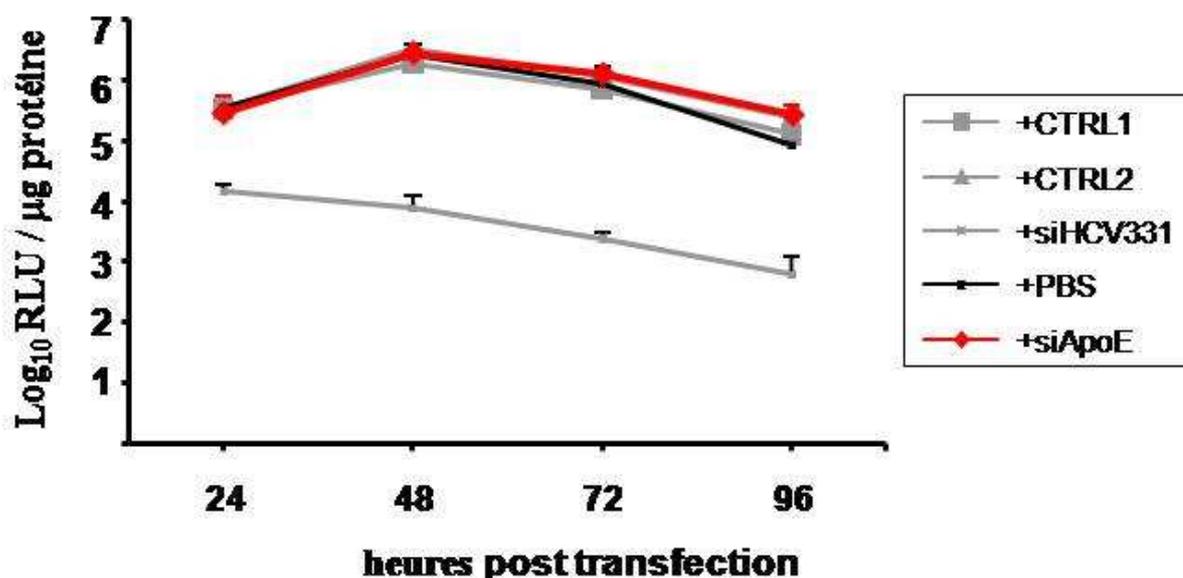


Figure 25: L'inhibition de l'expression d'ApoE n'affecte pas la réplication de Jc1-Luc.

Des cellules Huh7.5 transfectées avec des siARNs spécifiques d'ApoE (siApoE) ou des siARNs contrôle (siCTRL1, siCTRL 2) ou siHCV331 (bloquant spécifiquement la traduction du virus) voire du PBS seul sont incubées 72 heures puis réélectroporées avec 10 µg d'ARN viral Jc1-Luc. La réplication de l'ARN viral est quantifiée par mesure de l'activité luciférase à 24, 48, 72 et 96 heures.

III.6.2 L'inhibition de l'expression d'ApoE limite sévèrement la production de particules infectieuses du VHC.

Parmi les étapes essentielles du cycle viral, figurent l'assemblage et l'export. Nous avons voulu connaître l'impact d'ApoE sur ces aspects de la vie du virus. De petits ARNs interférents spécifiques ont été utilisés pour réduire l'expression d'ApoE dans des cellules Huh7.5 comme précédemment. Au bout de 72 heures, l'expression d'ApoE dans ces cellules est inhibée. L'ARN viral Jc1-Luc est ensuite électroporé dans ces cellules et dans des cellules témoins préalablement transfectées par un ARN interférent non spécifique (CTRL1 et siCTRL2) ou avec du PBS seul. L'effet de l'inhibition sélective d'ApoE sur la production du VHC est déterminé par la mesure de l'infectivité des surnageants des cultures de ces cellules sur des cellules Huh7.5 naïves. Pour cela, les milieux de culture ont été collectés au bout de 72 heures et concentrés 50 fois. Ces surnageants d'infection concentrés sont ensuite utilisés pour infecter des cellules Huh7.5 naïves. L'infectivité des surnageants a été testée par la mesure de l'activité luciférase dans les lysats de cellules Huh7.5, 72 heures après infection. (Figure 26).

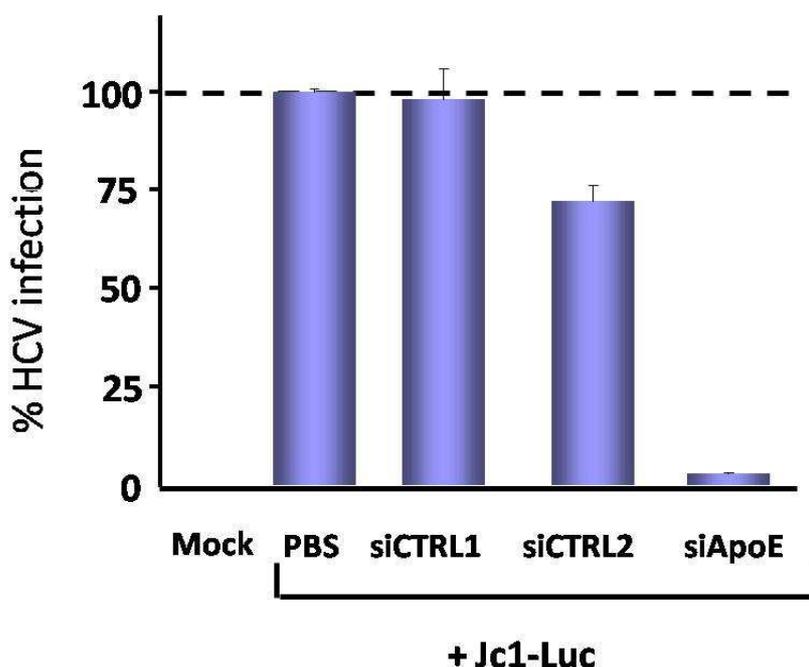


Figure 26: L'inhibition de l'expression d'ApoE entraîne un blocage de la production de particules virales.
Des cellules Huh7.5 non transfectées (Mock) ou transfectées avec des siARNs (siCTRL1, siCTRL2, siApoE) ou du PBS ont été électroporées au bout de 72 heures avec 10 µg d'ARN viral Jc1-Luc. Au bout de 72 heures, les surnageants de culture sont collectés et concentrés 50 fois. 150 µL de ce surnageant concentré sont ensuite utilisés pour infecter $6 \cdot 10^4$ cellules Huh7.5 naïves. Après 72 heures, l'infectivité des surnageants a été quantifiée par mesure de l'activité luciférase dans les lysats de cellules Huh7.5.

Le titre infectieux de virions du VHC sécrétés dans le milieu est considérablement réduit par l'inhibition sélective de l'expression d'ApoE. En effet, les ARNs interférents spécifiques d'ApoE diminuent ce titre infectieux d'un facteur 20 (comparer siApoE / siCTRL1).

Ces résultats montrent que l'inhibition de l'expression d'ApoE entraîne une réduction marquée de la production de virions infectieux du VHC et soulignent l'importance cruciale de cette protéine pour la production de virions infectieux. Cette réduction pourrait résulter d'un défaut d'assemblage ou d'une perturbation de la sécrétion.

III.7 NS5A est la seule protéine virale interagissant avec ApoE en double-hybride

Pour mieux comprendre le rôle d'ApoE dans le cycle viral, nous avons testé son interaction avec les protéines non structurales du VHC mais aussi avec Core dans le système des doubles-hybrides dans la levure. Cette méthode permet de détecter voire de cartographier des interactions entre des protéines d'intérêt en tirant avantage de la structure modulaire des facteurs de transcription. L'une des protéines d'intérêt est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription tandis que l'autre protéine d'intérêt est fusionnée à un domaine activateur de la transcription. En cas d'interaction entre ces deux protéines chimériques, il y a reconstitution d'un facteur de transcription hybride, qui permet la transcription de gènes rapporteurs *HIS3* et *LacZ* (Fields and Song, 1989). **(Figure 36, page 138)**. Ainsi, les protéines non structurales, mais aussi Core fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ont servi d'appâts tandis qu'ApoE exprimée en fusion avec le domaine activateur de Gal4 servait de proie. Les plasmides portant les fusions d'intérêt ont été cotransfectés dans la levure AH109 par la méthode à l'acétate de lithium. La culture s'est faite sur un milieu hautement sélectif SD/-LEU-TRP-ADE-HIS pendant 10 à 14 jours. Seule la protéine multifonctionnelle NS5A interagissait avec ApoE dans ce système d'analyse. **(Figure 27)**.

Il est à préciser que c'est la protéine ApoE entière qui a été utilisée dans la présente expérience.

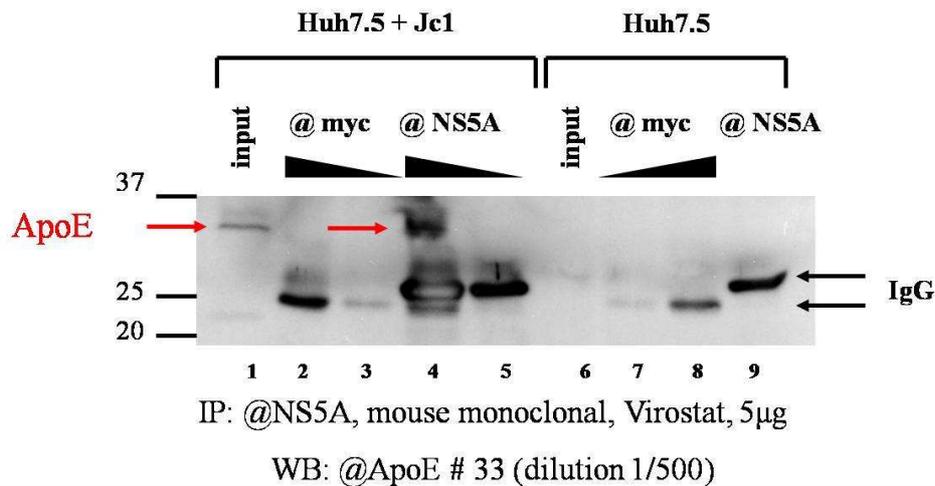


Figure 28: ApoE et NS5A interagissent dans des cellules Huh7.5 répliquant Jc1

Des cellules Huh7.5 ont été électroporées avec l'ARN Jc1 transcrit *in vitro*. Après 72 heures d'incubation, les cellules ont été collectées et lysées puis centrifugées. Les surnageants ont été incubés overnight à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-NS5A ou anti-myc et des billes d'agarose (A/G). Après plusieurs lavages puis centrifugation, les protéines du surnageant sont séparées par SDS-PAGE et le complexe protéique est révélé par western blot avec un anticorps spécifique d'ApoE. NS5A interagit spécifiquement avec ApoE (colonne 4).

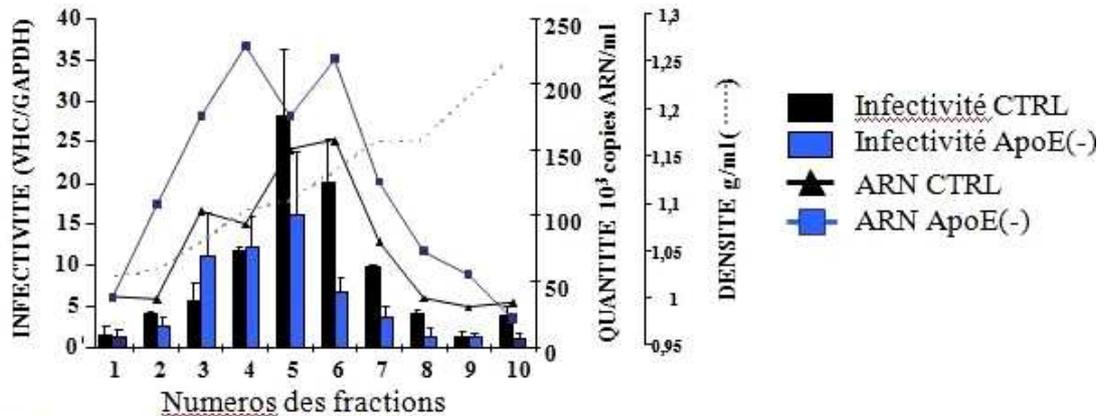
III.9 ApoE est requis pour la production de particules virales infectieuses

La déplétion d'ApoE dans les cellules Huh7.5 répliquant Jc1 provoque une baisse drastique de la sécrétion de virions infectieux. Afin de déterminer si cette baisse d'infectiosité est due à un défaut d'assemblage des virions et/ou à une atteinte du processus d'export des virions, nous avons purifié des virions provenant (i) de cellules Huh7.5 répliquant Jc1 transfectées au préalable par des siApoE ou des siCTRL, (ii) des surnageants de culture de ces mêmes cellules. Si l'inhibition de l'expression d'ApoE entraîne un défaut d'assemblage des virus, la production des lysats et des surnageants de ces cellules sera considérablement affectée. Par contre, si ce n'est que le processus d'export qui est touché par l'absence d'ApoE, alors seul le nombre de virions présent dans le surnageant des cellules sera diminué.

Les virions que nous avons obtenus soit par lyse des cellules soit par concentration des surnageants de culture ont été purifiés sur des gradients d'iodixanol. L'iodixanol est une molécule isotonique et isoosmotique au plasma dont les gradients sont de qualité supérieure aux gradients de sucrose et de bromure de sodium pour la préservation des complexes virus-lipoprotéines (Nielsen et al., 2006). Nous avons ensuite procédé à l'infection de cellules Huh7.5 à partir des fractions de ces virions purifiés. L'infectivité a été quantifiée par la mesure de l'ARN viral produit en RT-PCR quantitative au bout de 72 heures. Il est apparu

que les fractions de virions sécrétés avaient une infectivité considérablement diminuée par rapport au contrôle (en A, comparer barres bleues (ApoE-) aux barres noires (CTRL) des fractions 5, 6, 7). *A contrario*, les fractions purifiées des virions intracellulaires étaient infectieuses et l'assemblage du virus semblait se faire en dépit de l'inhibition de l'expression d'ApoE (en B, comparer barres bleues (ApoE-) aux barres noires (CTRL) des fractions 5, 6, 7). (**Figure 29**). Ces résultats suggèrent qu'ApoE est requis pour l'export des particules virales et non pour leur assemblage.

A. Virions extracellulaires



B. Virions intracellulaires

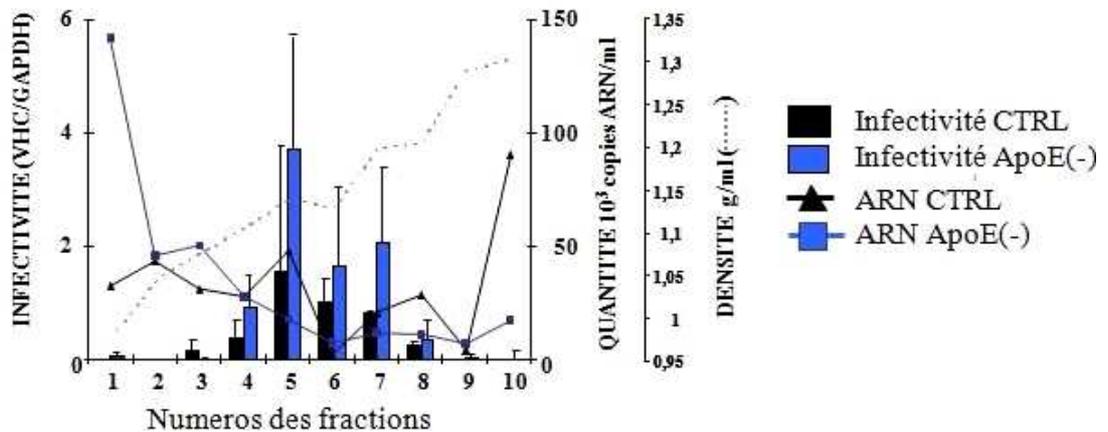


Figure 29: Infectivité des virions intracellulaires ou extracellulaires du VHC purifiés au moyen de gradients d'iodixanol.

Les surnageants de culture (A) et les lysats (B) de cellules Huh7.5 électroporées avec des siARNs contrôles (CTRL) ou spécifiques de ApoE ((ApoE⁻)) et répliquant Jc1 ont été purifiés au moyen de gradients d'iodixanol après concentration. L'infectivité des fractions a été testée sur des cellules Huh7.5 naïves. La quantité d'ARN dans chaque fraction a été mesurée par RT-PCR quantitative (RT-PCRq) (courbes noires et bleues). L'infectivité a été évaluée au bout de 72 heures par RT-PCRq et normalisée en la rapportant à la quantité d'ARN d'actine (barres noires et bleues). La densité (g/ml) des différentes fractions est représentée par la courbe en pointillés. Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

III.10 Une délétion dans le domaine III de NS5A perturbe l'interaction avec ApoE

Des études récentes suggèrent fortement l'implication d'ApoE (Chang et al., 2007) et de NS5A (Miyanari et al., 2007; Appel et al., 2008; Masaki et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008) dans l'assemblage des virions. Deux d'entre elles décrivent des mutants de délétion dans le domaine III de NS5A qui sont délétères pour l'assemblage (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Nous avons émis l'hypothèse que ce blocage pourrait venir d'une moindre interaction avec ApoE. Nous avons donc testé l'interaction d'un de ces mutants avec ApoE dans le système des doubles-hybrides. Nous montrons que cette mutation entraîne une diminution de l'interaction avec ApoE (**Figure 30**), ce qui peut orienter également vers un rôle de cette protéine dans l'assemblage. H77 est un génome VHC infectieux de génotype 1b et qui atteste que l'interaction NS5A-ApoE n'est pas limitée à un seul génotype.

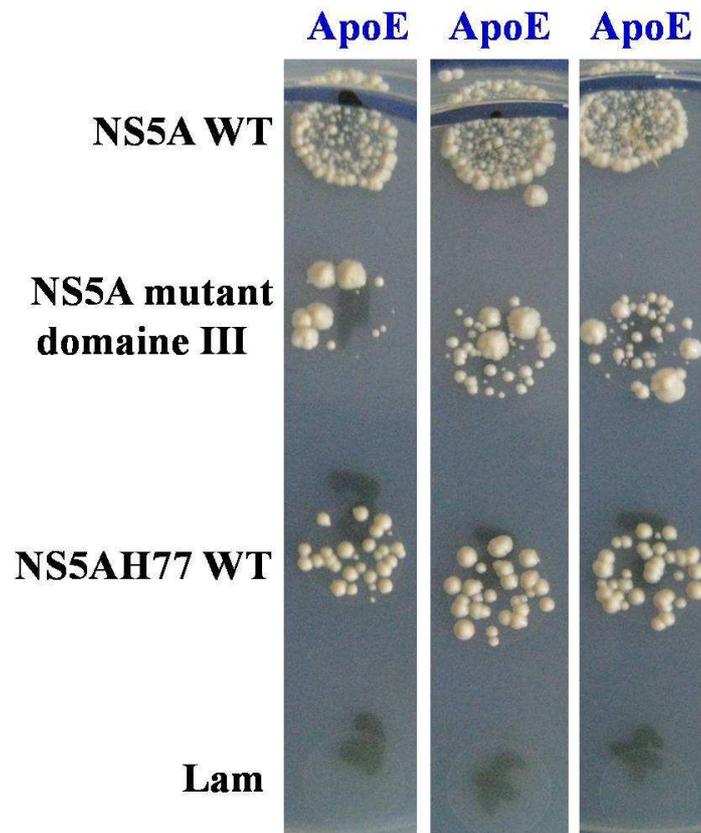


Figure 30: Une mutation du domaine III de NS5A est délétère pour l'interaction avec ApoE

La levure AH109 est cotransformée d'une part par pGBKT7-NS5A (WT ou Muté) ou pGBKT7-Lam et d'autre part pGADT7-ApoE. Après 10 j d'incubation à 30°C, on note une moindre pousse du mutant (comparer NS5A WT / NS5A mutant domaine III).

IV DISCUSSION

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que l'extrémité 3' du brin (-) du VHC était structurée en deux domaines: le domaine I et le domaine II. Le domaine I, plus stable comporte 5 tiges-boucles SLAI, SLBI, SLCI, SLDI et SLEI dont la dernière présente 60% d'homologie de séquence avec la tige-boucle SLII de l'extrémité 3' du brin (+) (**Figure 19, page 87**) (Schuster et al, 2002). SLII se situe dans la région X très conservée et joue un rôle important dans la réplication de l'ARN génomique (Kolykhalov et al., 2000; Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003) mais aussi dans l'infectivité des virions (Waris et al., 2004). L'extrémité 3' du brin (-) permet l'initiation de la synthèse du brin (+) et nous avons émis l'hypothèse que la tige-boucle SLEI pourrait jouer un rôle essentiel dans le cycle viral. Dans cette étude, nous avons testé cette hypothèse par le criblage d'une banque d'ADNc de foie humain avec la tige-boucle SLEI servant d'appât en utilisant la méthode du triple hybride dans la levure (SenGupta et al., 1996). Nous avons montré qu'elle interagit avec une forme tronquée d'ApoE (ApoE-Cterm) (**Figure 22, page 91**). Cette liaison est spécifique et fait intervenir les nucléotides communs à SLEI et SLII (**Figure 23, page 92**); ce qui laisse augurer un rôle dans le cycle viral. Les tests effectués avec la protéine ApoE entière se sont montrés non concluants dans notre système. Toutefois, étant donné qu'ApoE est une protéine hépatique impliquée dans le métabolisme lipidique (Mahley, 1988; Mahley and Rall, 2000) et la production de particules virales (Chang et al., 2007; Nielsen et al., 2008), nous avons recherché l'impact de cette protéine sur le cycle viral. Ainsi, l'expression d'ApoE a été spécifiquement inhibée au moyen de petits ARNs interférents spécifiques. Ce blocage n'a pas eu d'impact sur la réplication de l'ARN génomique (**Figure 25, page 94**). En revanche, il a drastiquement limité l'export de virions infectieux (**Figure 26, page 95**). Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude récente qui montre qu'ApoE est requis pour la sécrétion du VHC (Chang et al., 2007). Ce défaut pouvant résulter d'une interférence au niveau de la sécrétion proprement dite ou provenir d'une déficience plus précoce au niveau de l'assemblage, nous avons tenté de discriminer ces deux possibilités en testant l'infectivité de virions intracellulaires purifiés à partir de cellules (siApoE) lysées ou celle de virions sécrétés dans le milieu de culture. Il est apparu que l'inhibition de l'expression de l'ApoE ne perturbait pas l'assemblage mais la sécrétion des virions. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de l'étude de Chang qui montre une inhibition de l'assemblage induite par le blocage spécifique de l'expression d'ApoE (Chang et al., 2007). Ils sont aussi en désaccord avec ceux de Huang et coll. qui suggèrent que la colocalisation de la réplication du VHC et de l'assemblage des VLDL pourraient procéder de la nécessité d'un co-assemblage et d'une co-sécrétion des VLDL et des particules virales (**Figure 15, page 58**); soulignant un rôle

potentiel d'ApoE, un constituant majeur des VLDL dans l'assemblage du virus (Huang et al., 2007). Cette discordance pourrait s'expliquer par le fait que l'inhibition de l'expression d'ApoE par des ARNs interférents spécifiques n'est pas totale et que la quantité résiduelle de la protéine pourrait suffire à induire les mécanismes d'assemblage observés dans les fractions intracellulaires. Par contre, la sécrétion des particules virales qui nécessiterait de plus grandes quantités d'ApoE (Andre et al., 2005; Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008) pourrait être proportionnellement perturbée. Un nombre croissant de publications souligne en effet l'extraordinaire dépendance du cycle viral pour le métabolisme lipidique de la cellule-hôte. Il a été rapporté que les virions infectieux du VHC sont exportés ou trouvés dans le cytoplasme sous forme de particules lipovirales du fait de leur association à des lipoprotéines (Andre et al., 2002; Andre et al., 2005). Plusieurs groupes ont montré que la réplication de l'ARN génomique était fortement liée aux voies de synthèse des lipides et sensible à l'interférence pharmacologique des statines et de certains acides gras (Ye et al., 2003; Kapadia and Chisari, 2005). D'autres travaux associent la partie intracellulaire du cycle viral à la biogénèse hépatique des VLDL (Nielsen et al., 2006; Chang et al., 2007; Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008). En effet dans les fractions membranaires intracellulaires isolées de cellules Huh7 portant des réplicons du VHC, les protéines ApoE, ApoB et MTP requises pour l'assemblage des VLDL co-purifient avec des complexes de réplication du VHC (Huang et al., 2007). Comme les autres virus à ARN de polarité positive, la réplication du génome du VHC se fait dans des complexes de réplication associés aux membranes contenant des protéines virales et cellulaires (Egger et al., 2002; El-Hage and Luo, 2003; Moradpour et al., 2003). Elle a pour effet d'induire une perturbation des membranes du réticulum endoplasmique (RE), résultant en des structures appelées réseaux membranaires (Konan et al., 2003; Rouille et al., 2006). De plus dans les cellules infectées par le VHC, l'hétérodimère E1/E2 est retenu dans le RE (Rouille et al., 2006) qui est par ailleurs le site d'assemblage des lipoprotéines (Fisher and Ginsberg, 2002). Ainsi, la réplication des virions et l'assemblage des VLDL se font dans le même compartiment intracellulaire, ce qui pourrait fournir une base structurale pour l'établissement de particules lipovirales qui sont ensuite exportées par la voie des VLDL. Ce schéma présenterait au moins deux avantages: d'abord, il est possible que la machinerie de sécrétion des VLDL favorise un environnement intracellulaire optimal pour le cycle viral du fait de sa richesse en lipides (Kapadia and Chisari, 2005). Ceci faciliterait la maturation et la sécrétion du virus en raison d'un export lipidique réduit (Lonardo et al., 2004; Napolitano et al., 2007). Il est aussi possible que l'association aux lipoprotéines confère aux particules lipovirales un avantage par rapport aux virions immatures du fait de la protection des épitopes

de l'enveloppe virale par les lipoprotéines de l'hôte, limitant la reconnaissance par le système immunitaire ou fournissant des ligands cellulaires pour la liaison aux corécepteurs cellulaires (Agnello et al., 1999; Bartosch et al., 2003b; Kapadia et al., 2007). Dans une étude pionnière, André et al. ont montré l'intégration des virions infectieux dans des particules lipoprotéiques de type VLDL (André et al., 2002). Plus récemment, Nielsen et coll. ont confirmé cette association par le fait que des anticorps polyclonaux anti-ApoE et anti-ApoB précipitaient 90% des particules virales de basse densité dans le sérum des patients ou en culture cellulaire (Nielsen et al., 2006). Cette étude montre une plus forte et plus interne association d'ApoB du fait de son maintien après traitement des particules lipovirales par des détergents. Les derniers résultats de cette équipe montrent néanmoins une grande complexité du mécanisme qui au niveau de l'entrée diffère de celui des LDL (Martin et al., 2008). Les travaux de Huang et coll. (Huang et al., 2007) et Gastaminza et coll. (Gastaminza et al., 2008) insistent sur l'importance d'ApoB et du MTP appartenant à la machinerie de synthèse des VLDL pour la genèse des virions mais nos résultats tout comme ceux de Nielsen et coll. (Nielsen et al., 2006) et Chang et coll. (Chang et al., 2007) montrent une forte implication d'ApoE dans le processus. Cette protéine est par ailleurs l'élément discriminant entre LDL et VLDL. On pourrait expliquer nos observations par une intervention plus tardive d'ApoE dans les processus d'assemblage et surtout de sécrétion étant donné que cette protéine est localisée à la surface des lipoprotéines.

Initialement connue comme un déterminant majeur du métabolisme des lipoprotéines et de maladies cardiovasculaires du fait de son rôle dans le transport des lipides, l'ApoE est apparue au cours des dernières années comme une protéine importante dans plusieurs processus biologiques qui ne sont pas directement liés au métabolisme lipidique parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer, la fonction cognitive, l'immunorégulation et les infections virales. C'est une protéine polymorphique de 299 acides aminés dont les 3 isoformes ApoE2, ApoE3 et ApoE4 qui diffèrent par une substitution ponctuelle des aminoacides aux positions 112 et 158, induisent des conséquences fonctionnelles profondes au niveau cellulaire et moléculaire (**Figure 31**). Ainsi, alors qu'ApoE3 (C112, R158) paraît être l'isoforme normale, ApoE2 (C112, C158) est associée à l'hyperlipoprotéïnémie de type III tandis qu'ApoE4 (R112, R158) est un facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose et la perturbation de la fonction cognitive (Mahley and Rall, 2000).

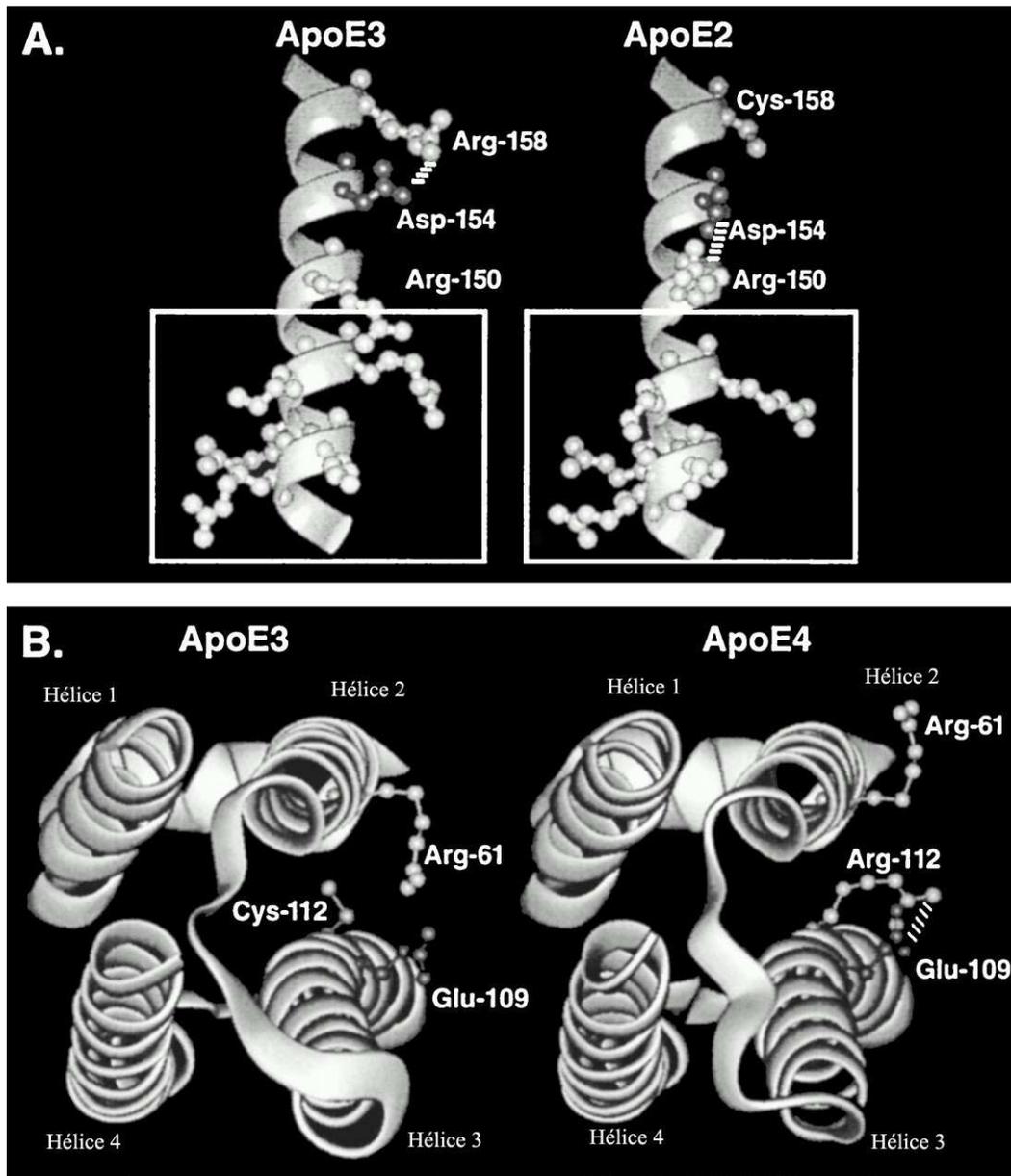


Figure 31: Structure tridimensionnelle des régions spécifiques des isoformes d'ApoE

(A)- En encadré, la région de l'hélice 4 où le réarrangement d'une liaison ionique réduit le potentiel cationique du site de liaison au LDL-R d'ApoE2. D154 change son interaction ionique avec R150 suite à la substitution par C158. La chaîne latérale de R150 est exclue du nuage cationique, abaissant son potentiel et réduisant de 100 fois la capacité de liaison au LDL-R d'ApoE2. (B)- La substitution de R112 dans ApoE4 entraîne une interaction ionique avec E109 qui déplace la chaîne latérale de R61 de sa position habituelle, l'expose davantage à la partie latérale de l'hélice 2 et la rend disponible pour l'interaction avec E255 dans la partie carboxy-terminale d'ApoE (non illustré ici). Adapté de (Mahley and Rall, 2000)

Il a été décrit qu'ApoE intervenait dans la susceptibilité à plusieurs infections virales. Une étude récente indique qu'ApoE4 humaine est un facteur de risque dans l'herpès oculaire murin induit par HSV-1 (Bhattacharjee et al., 2008). Les travaux de deux autres équipes

présentent cette même isoforme comme stimulant l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles et accélérant la progression de la maladie (Burt et al., 2008) mais l'associent aussi à des niveaux d'anticorps élevés dans l'infection par le CMV (Aiello et al., 2008). Dans le cas particulier du VHC, contrairement à son impact dans l'infection par les virus précités, des études indiquent un caractère protecteur d'ApoE4. Elle protégerait des formes sévères de l'hépatite induite par le virus (Wozniak et al., 2002) et limiterait la progression des dommages histologiques chez les patients transplantés de sexe masculin (Toniutto et al., 2004). ApoE2 protégerait de l'infection par le VHC tandis qu'ApoE3 est associée à la persistance du virus (Price et al., 2006). Ces résultats font penser que les mécanismes impliquant ApoE dans la physiopathologie des maladies précitées diffèrent au moins au niveau moléculaire de ceux qui sous-tendent son intervention dans le cycle viral du VHC. Pour une compréhension plus intime de son mode d'action, nous avons recherché une éventuelle interaction d'ApoE avec les protéines virales. Nous montrons que seule la protéine multifonctionnelle NS5A interagit avec ApoE en double-hybride (**Figure 27, page 97**). Ce résultat a été confirmé par des expériences d'immunoprécipitation dans des cellules Huh7.5 sans surexpression préalable d'ApoE, ce qui renforce fortement son occurrence *in vivo* (**Figure 28, page 98**). NS5A a entre autres fonctions décrites, des propriétés de stimulation de la réplication de l'ARN génomique (Blight et al., 2000; Guo et al., 2001; Krieger et al., 2001; Lanford et al., 2003; Lohmann et al., 2003), mais surtout les derniers travaux soulignent son intervention dans l'assemblage des virions (Miyanari et al., 2007; Appel et al., 2008; Masaki et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Tirant parti du nouveau système de culture cellulaire du VHC (VHCcc) (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005), des équipes ont montré que les gouttelettes lipidiques servaient de plateformes d'assemblage aux virions (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007) et insisté sur le rôle central des protéines Core et NS5A dans ce mécanisme par le recrutement des autres protéines non structurales du complexe de réplication qui colocalise avec ces gouttelettes lipidiques (Miyanari et al., 2007; Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Deux publications parues en 2008 montrent qu'une mutation dans le domaine III de NS5A est abortive pour l'assemblage des virions (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). Nous avons généré ce mutant et testé son interaction avec ApoE en double-hybride. Nous montrons que cette mutation est significativement délétère pour l'interaction (**Figure 30, page 100**). Considérés dans leur ensemble, ces résultats font d'ApoE un candidat sérieux au processus d'assemblage et d'export. Toutefois, nous n'avons pas trouvé d'interaction d'ApoE avec Core, l'autre initiateur majeur de l'assemblage des virions (**Figure 17, page 60**) (Miyanari et al., 2007). Aussi, nous proposons qu'ApoE pourrait intervenir dans le processus

à l'intérieur d'un complexe où elle serait indirectement associée avec Core via NS5A et/ou d'autres protéines. Cette hypothèse pourra être vérifiée par des expériences de Tandem Affinity Purification (TAP) qui est une technique permettant l'expression et l'étude de complexes protéiques (Rigaut et al., 1999; Puig et al., 2001) dans lesquelles les trois protéines d'intérêt seraient coexprimées dans un contexte cellulaire puis immunoprécipitées avec des anticorps spécifiques avant d'être révélées par immunoblot.

Notre étude confirme le rôle décrit d'ApoE dans la sécrétion des virions du VHC (Chang et al., 2007) et même si nos résultats ne permettent pas de conclure à une implication dans l'assemblage, elles font d'ApoE ainsi que de l'interaction ApoE-NS5A une cible intéressante dans la thérapie anti-VHC du fait de l'intervention potentielle de cette protéine à différents niveaux du cycle viral à savoir l'entrée (Price et al., 2006), l'assemblage et l'export (Chang et al., 2007). L'inhibition sélective de cette protéine pourrait donc être d'un grand bénéfice dans la lutte contre cette infection pour laquelle les moyens préventifs et thérapeutiques sont encore dans un cas inexistant et dans l'autre limités. En ce sens, des publications décrivent le bénéfice des statines (inhibiteurs des HMG CoA réductase intervenant dans la voie de synthèse du Mevalonate) en adjuvant aux thérapeutiques actuelles dans le traitement de l'infection par le VHC (Ikeda et al., 2006; Torres and Harrison, 2008). Ces drogues (à l'exception de la pravastatine) auraient un effet antiviral direct par un mécanisme indépendant du métabolisme lipidique. En effet, elles entraînent une déplétion de l'isoprénoïde géranylgeranyl pyrophosphate qui induit un blocage de la réplication de l'ARN du VHC (Ye et al., 2003; Kapadia and Chisari, 2005). Cette molécule est attachée à des protéines G spécifiques au niveau des radeaux lipidiques dont l'un des constituants est le cholestérol et donc ApoE. Ces résultats encourageants devraient stimuler la recherche de nouvelles molécules ciblant cette protéine fortement impliquée dans la pathogénèse du VHC.

Une autre observation intéressante de notre étude est la différence d'interaction d'ApoE et de Core avec les protéines NS5A des génotypes 1b (H77) et 2a (Jc1) (**Figure 30, page 100 et Figure 32**) qui apparaît nettement plus forte avec le second. Ce résultat prend une importance particulière quand on l'associe au fait que l'interaction avec ApoE requiert la région V3 du domaine III de NS5A dont la séquence est l'une des plus variables au sein des différents génotypes et sous-types du VHC (Macdonald and Harris, 2004). Si l'implication du complexe ApoE-NS5A était confirmée dans l'assemblage et/ou l'export, elle pourrait constituer un élément d'explication de la plus grande efficacité des systèmes de culture cellulaire utilisant Jc1 (génotype 2a) par rapport à d'autres génotypes. Néanmoins, la signification physiologique

pourrait être très relative puisqu'à ce jour, la seule traduction clinique de la différence du génotype infectant chez les malades concerne la réponse au traitement et la stéatose pour le génotype 3 (Alric et al., 2000).



Figure 32: Différences d'interaction de Core avec NS5A selon le génotype.

La levure AH109 est cotransformée d'une part par pGBKT7-NS5A des souches H77 (1b) et Jc1 (2a) ou pGBKT7-Lam et d'autre part pGADT7-Core. Après 10 j d'incubation à 30°C, on note une moindre pousse pour NS5A/H77 (comparer NS5A/H77 WT et NS5A/Jc1 WT).

Nos travaux soulignent un rôle majeur d'ApoE dans l'export des virions du VHC. En ce qui concerne l'assemblage, nos résultats préliminaires sont encore contradictoires et feront l'objet d'investigations plus poussées. Nous proposons néanmoins ci-dessous, un modèle de l'implication d'ApoE dans l'export des virions du VHC. (**Figure 33**).

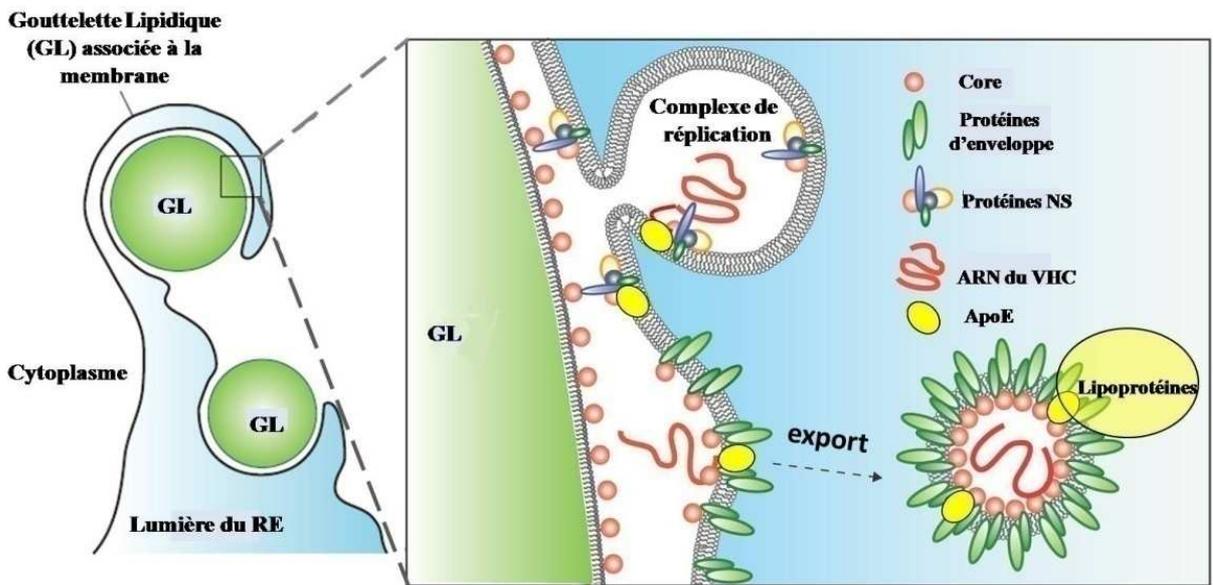


Figure 33: Modèle du rôle d'ApoE dans l'export des virions du VHC.

ApoE est associée à NS5A au niveau du complexe de réplication du virus qui colocalise avec les gouttelettes lipidiques. Elle favorise ensuite l'export des virions néoformés en association avec les lipoprotéines VLDL.

V PERSPECTIVES

Nos résultats sont en faveur d'une implication majeure d'ApoE dans le processus de sécrétion de particules infectieuses VHC. Mieux comprendre cette interaction étroite entre ApoE et le VHC permettrait à terme d'influer sur la production de particules virales en inhibant la synthèse d'ApoE dans le foie. ApoE est une protéine de 299 acides aminés qui est principalement synthétisée dans le foie (Mahley and Rall, 2000). Des données mesurées sur des hépatocytes primaires de souris ont montré que la protéine est principalement sécrétée dans le milieu de culture (75%). Toutefois, 20 % d'ApoE est localisé dans la cellule et 5% est associée aux protéoglycanes à la surface cellulaire (Auger et al., 2001). *In vivo*, ApoE est un constituant des lipoprotéines sériques et peut se lier aux récepteurs cellulaires impliqués dans l'internalisation des lipides comme le récepteur des LDL ou des VLDL favorisant l'import du cholestérol (Mahley, 1988) et du VHC dans l'hépatocyte. Au niveau du système nerveux central certaines isoformes d'ApoE ont été associées à la maladie d'Alzheimer et ont donné lieu à de très nombreuses études (Cedazo-Minguez, 2007). Les perspectives de nos travaux sont centrées sur la confirmation du rôle d'ApoE dans le cycle viral du VHC.

Distribution de la protéine ApoE dans la cellule hépatique humaine saine ou produisant des particules virales infectieuses VHC

La rareté des données de la littérature concernant la localisation subcellulaire d'ApoE dans la cellule hépatocytaire humaine nous conduit à proposer cette étude. La protéine sera dans un premier temps détectée dans des cellules saines puis sa distribution sera comparée à celle de cellules répliquant activement le virus. Nous chercherons en particulier si ApoE est relocalisée dans les cellules VHC positives au niveau des réseaux membranaires abritant le complexe de réplication.

Confirmation de l'interaction directe entre ApoE et NS5A et Etude de complexes multiprotéiques.

Nous caractériserons plus précisément l'interaction ApoE-NS5A que nous avons mise en évidence par l'utilisation de mutants. Un point important sera de définir si les mutants ponctuels de NS5A définis comme délétères pour l'accomplissement d'un cycle viral complet par Miyanari et al. (Miyanari et al., 2007) sont impliqués dans l'interaction NS5A-ApoE que nous avons mise en évidence par double hybride dans la levure. Si tel est le cas, ce serait une preuve supplémentaire de l'implication de l'interaction NS5A-ApoE dans le mécanisme de sécrétion des particules virales.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre la protéine de capsid Core et ApoE (**Figure 27, page 97**) alors que nous montrons que NS5A interagit avec ces deux protéines (**Figures 30 et 32, pages 100 et 108**). Des travaux antérieurs ont montré une interaction de Core avec l'apolipoprotéine AII qui favoriserait la sécrétion des deux protéines (Sabile et al., 1999). Une autre étude montre que NS5A colocalise avec Core à la surface des gouttelettes lipidiques et dans des lignées cellulaires hépatiques et non hépatiques, mais aussi qu'elle interagit avec ApoAI et ApoAII (Shi et al., 2002). Il serait intéressant de rechercher par la technique du Tandem Affinity Purification un complexe entre Core, NS5A et les apolipoprotéines E, AI et AII. On peut penser qu'un partenaire supplémentaire de cette coopération pour la sécrétion des particules virales est pour le moment manquant. Une de nos hypothèses est d'explorer le rôle de la protéine p7 qui est une protéine virale ayant un rôle de viroporine dans la cellule infectée (Carrere-Kremer et al., 2002). Cette protéine a été définie comme nécessaire à la sécrétion de particules virales infectieuses (Steinmann et al., 2007). En effet, elle est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique et pourrait faire partie d'un complexe multiprotéique rassemblant ApoE, NS5A et Core.

Association d'ApoE à la particule virale lors de sa biosynthèse dans la cellule hépatocytaire

La preuve de l'association directe d'ApoE à la particule virale dès sa production dans la cellule hôte serait une donnée cruciale pour le développement de nouvelles voies thérapeutiques. Pour l'instant aucune preuve directe n'a montré qu'ApoE était associée à la particule virale VHC lors de la biosynthèse de la particule virale. En effet, nos résultats préliminaires semblent montrer que les particules issues d'extraits intracellulaires de cellules n'exprimant plus ApoE (inhibée par ARN interférence) sont capables d'infecter des cellules Huh7.5 naïves. Ces données sembleraient donc être en faveur d'un rôle d'ApoE dans la dynamique de sécrétion ou de maturation des particules VHC. Ce rôle est à mettre en parallèle avec le rôle d'ApoE dans la biosynthèse des VLDL. Dans ce cas également, le rôle d'ApoE n'est pas dans la formation des VLDL mais dans leur maturation et leur sécrétion (Maugeais et al., 2000; Shelness and Sellers, 2001). Nous envisageons de préparer des extraits intracellulaires et extracellulaires provenant de cellules répliquant le virus. Après enrichissement des préparations sur gradient d'iodixanol puis immunoprécipitation des particules virales avec des anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe E2 nous détecterons la protéine ApoE par western blot.

Si la protéine ApoE s'associe naturellement à la particule virale en maturation, les cellules hépatocytaires répliquant le virus devraient accuser un déficit voire une absence de maturation et de sécrétion de VLDL. Cette hypothèse, déjà proposée par Perlemuter et al. (Perlemuter et al., 2002) sera confirmée en dosant le taux d'Apolipoprotéine B (un constituant majeur des VLDL) produit par des cellules hépatocytaires répliquant le VHC (Fisher and Ginsberg, 2002; Gastaminza et al., 2008).

Ces travaux complémentaires confirmeront l'implication majeure d'ApoE dans la production de particules virales infectieuses.

VI MATERIELS ET METHODES

VI.1 MATERIELS

VI.1.1 Levures

Les levures utilisées dans notre étude sont toutes dérivées de *Saccharomyces cerevisiae*.

VI.1.1.1 YBZ1

Son génotype est *MATa*, *ura3-52*, *leu2-3*, *112*, *his3-200*, *trp1-1*, *ade2*, *LYS2* :: (*LexAop*)-*HIS3*, *ura3* :: (*lexA-op*)-*lacZ*, *LexA-MS2 coat (N55K)*. Elle est dérivée de la souche L40 coat traditionnellement utilisée pour les tests triple-hybride. Elle est plus spécifique, plus sensible et génère moins de faux positifs du fait d'une mutation N55K dans la protéine MS2 coat (Bernstein et al., 2002). Elle contient dans son génome le gène codant pour l'hybride protéique « LexA-MS2 coat » ainsi que les gènes rapporteurs *LacZ* et *HIS3*. Ces derniers sont inductibles par le transactivateur Gal4. Nous l'avons obtenu du Dr Marvin Wickens (Wisconsin University, Madison USA).

VI.1.1.2 Y187

Son génotype est *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *met* -, *URA3* :: *GALIUAS-GALITATA-lacZ MEL1* (Harper et al., 1993). Elle est le partenaire de croisement de YBZ1 dans les tests triple-hybride.

VI.1.1.3 AH109

Son génotype est *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* :: *GALIUAS-GALITATA-HIS3*, *GAL2UAS GAL2TATA-ADE2 URA3* :: *MELIUAS-MELITATA-lacZ MEL1*. Elle est utilisée pour les tests double-hybride et contient les gènes rapporteurs *LacZ*, *HIS3* et *MEL1* inductibles par le transactivateur Gal4.

Les souches AH109 et Y187 sont commerciales (Clontech Paris).

Des levures sont cultivées à 30°C, en milieu YPD liquide (Difco peptone 20 g/l, Yeast extract 10 g/l, adenine 20 mg/l pour AH109) ou solide (addition d'agar 20 g/l) pour maintenir le phénotype. En revanche, elles sont cultivées sur un milieu minimum SD (YNB 6,7g (+ 20g/l d'agar pour les boites)) additionné d'acides aminés ou d'adénine selon le plasmide par lequel elles sont transformées.

VI.1.2 Bactéries

Les bactéries utilisées sont toutes dérivées de *Escherichia coli*. Elles 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'un antibiotique auquel elles sont rendues résistantes par le plasmide qui les transforme.

VI.1.2.1 XL1 blue

C'est une souche commerciale (Stratagene) de génotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*. Elle a été utilisée pour les clonages ampicilline et kanamycine.

VI.1.2.2 TG1

C'est une souche commerciale (Stratagene) de génotype *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK⁻ mK⁻) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]*. Elle a été utilisée pour les clonages tétracycline.

VI.1.2.3 KC8

Ces bactéries commerciales (Clontech) de génotype *hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU,K* sont électrocompétentes et présentent l'intérêt d'être auxotrophes pour la leucine, le tryptophane et l'histidine. Elles permettent l'analyse des clones candidats de la banque d'ADNc en les cultivant sélectivement après électroporation de leurs extraits plasmidiques sur un milieu M9 dépourvu de leucine.

VI.1.3 Lignées cellulaires

VI.1.3.1 Huh7.5

Cette lignée cellulaire humaine qui est dérivée de la lignée Huh7 (Nakabayashi et al., 1982), nous a été donnée par le Dr Rice (New York, USA). Elle a été sélectionnée par la culture en présence d'interféron α de cellules Huh7 transfectées par des réplicons subgénomiques du VHC (Blight et al., 2002). Ces cellules guéries de l'infection par le VHC se sont révélées plus permissives à l'infection par le VHC avec la production de plus hauts titres en ARN que les Huh7 utilisées jusqu'ici.

VI.1.3.2 Huh7.5.1

Cette lignée est elle-même dérivée de la lignée Huh7.5. Elle a été sélectionnée par la culture en présence d'interféron α de cellules Huh7.5 transformées par des réplicons subgénomiques du VHC et s'est révélée encore plus permissive à l'infection par le clone infectieux JFH1 du VHC que les premières (Zhong et al., 2005).

VI.1.4 Les plasmides

pMS2-2

Ce plasmide est utilisé pour faciliter la construction de l'ARN hybride. Il est dérivé de BluescriptIIKS+, mais porte le gène de résistance à la tétracycline et ne contient aucun gène ni promoteur de levure. Il permet uniquement de cloner l'ADN codant la séquence d'ARN d'intérêt près des sites MS2 d'ancrage de la protéine MS2 coat puis de transférer cette construction dans pIIIAMS2-2.

pIII/MS2.2

Ce plasmide navette multicopie a été utilisé dans la technique du triple hybride, pour exprimer l'ARN hybride contenant le site de fixation de la protéine de capsid du phage MS2 suivi de l'ARN étudié. Cette molécule est transcrite à partir du promoteur fort de l'ARN polymérase III de l'ARN de la RNase P. Le plasmide contient le marqueur d'auxotrophie *URA3* ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline, permettant son maintien dans la levure et *E. coli* respectivement. Nous avons utilisé les constructions pIII/HP-MS2 où la séquence correspondant à la tige-boucle ou « hairpin » (HP) à tester est clonée dans la cassette du vecteur. Ainsi, le plasmide pIII/wtHP-MS2 permettra d'exprimer, dans le contexte du triple hybride, un ARN hybride contenant les tige-boucle sauvages ou mutées.

pACT2

Ce plasmide navette multicopie est une version élaborée de pACT qui dispose d'un plus grand nombre de sites de restriction au sein de sa cassette de clonage, ainsi que d'un marqueur contenant l'épitope HA. Il permet l'expression, à partir du promoteur de l'alcool déshydrogénase, d'une protéine d'intérêt fusionnée au domaine activateur de Gal4 intervenant dans le triple hybride. Il contient en outre un gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans *E. coli* et un marqueur d'auxotrophie *LEU2* pour son maintien dans la levure ou dans les cellules *KC8*. C'est dans ce vecteur que sont clonés, fusionnés à *GAL4*, les ADNc de la banque.

pGBKT7

Ce vecteur permet l'expression de protéines fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. Dans la levure, les protéines de fusion sont exprimées à partir du promoteur constitutif *ADHI* (P_{ADHI}). La transcription est terminée par les signaux terminateurs de transcription *T7* et

ADHI (T_{T7} & $ADHI$). pGBKT7 contient aussi le promoteur *T7*, un marqueur contenant l'épitope c-Myc et une cassette de clonage. C'est un vecteur navette qui se réplique de façon autonome *E. coli* et *S cerevisiae*. Il contient un gène de résistance à la kanamycine pour sa sélection dans *E coli* et un marqueur d'auxotrophie *TRP1* pour son maintien dans la levure. Les levures contenant pGKT7 présentent une meilleure efficacité de transformation que les souches portant des vecteurs ayant un autre domaine de liaison à l'ADN (Louvet et al., 1997).

pGADT7

Ce vecteur permet l'expression de protéines fusionnées au domaine d'activation de Gal4. Dans la levure, les protéines de fusion sont exprimées à partir du promoteur constitutif *ADHI*(P_{ADHI}), la transcription est arrêtée par un signal de terminaison *ADHI* (T_{ADHI}). La protéine de fusion est orientée vers le noyau de la levure par des séquences de localisation nucléaire de SV40 qui ont été rajoutées à la séquence du domaine d'activation (Chien et al., 1991). pGADT7 contient aussi le promoteur *T7*, un marqueur contenant l'épitope HA et une cassette de clonage. C'est un vecteur navette qui se réplique de façon autonome dans *E coli* et *S cerevisiae* à partir des origines de réplication pUC et 2μ ori respectivement. Il porte en outre un gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans *E coli* et un marqueur *LEU2* d'auxotrophie permettant sa sélection dans la levure.

pCINeo

Ce plasmide commercial (Promega) est un vecteur d'expression eucaryote qui contient la région promotrice/activateur (enhancer) du cytomégalo virus humain en amont de la cassette de clonage. 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 dans les bactéries. pCINeo peut être utilisé pour des expériences d'expression transitoire ou pour l'établissement de lignées stables.

pcDNA3.1/Hygro(+)

Ce vecteur commercial (Invitrogen) est dérivé de pcDNA3.1 et est conçu pour de hauts niveaux d'expression stable ou transitoire dans des cellules de mammifères. Il comporte la région promotrice/activatrice (enhancer) du cytomégalo virus humain en amont de la cassette de clonage. Il comporte deux gènes de résistance: l'un à l'ampicilline pour la sélection du

vecteur dans *E. coli*, l'autre à l'hygromycine pour la sélection de transfectants stables dans les lignées cellulaires de mammifères.

VI.1.5 Les virus

VI.1.5.1 JFH1

C'est un réplicon de génotype 2a construit à partir de la séquence consensus de JFH1 (pour Japanese Fulminant Hepatitis 1), une souche du VHC isolée chez un patient japonais de 32 ans ayant développé une hépatite fulminante et qui a la capacité de se répliquer efficacement dans les cellules Huh7.5 sans pression de sélection antibiotique (Kato et al., 2001; Kato et al., 2003; Wakita et al., 2005). (**Figure 34**).



Figure 34: Structure du réplicon génomique JFH1 de génotype 2a.

Le cadre de lecture ouvert est flanqué par les régions non traduites 5' et 3'. Adapté de (Kato et al., 2003)

VI.1.5.2 Jc1

C'est un virus chimérique intragénotypique (2a) résultant de la fusion des codons 1-846 du réplicon J6/CF et 847-3033 de JFH1. C'est à ce jour le réplicon du VHC le plus infectieux en culture cellulaire (Pietschmann et al., 2006). (**Figure 35**).

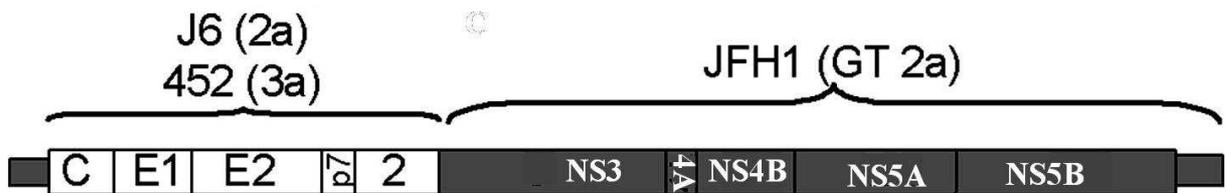


Figure 35: Structure du réplicon génomique intragénotypique Jc1.

Adapté de (Pietschmann et al., 2006)

VI.1.5.3 Jc1-Luc

Il est construit à partir du réplicon Jc1 décrit ci-dessus par la fusion en phase du gène codant la luciférase aux 16 résidus N-terminaux de la région codant Core dans JFH1 suivi de l'IRES du CMV qui permet l'expression des protéines virales (Koutsoudakis et al., 2006). (**Figure 36**).

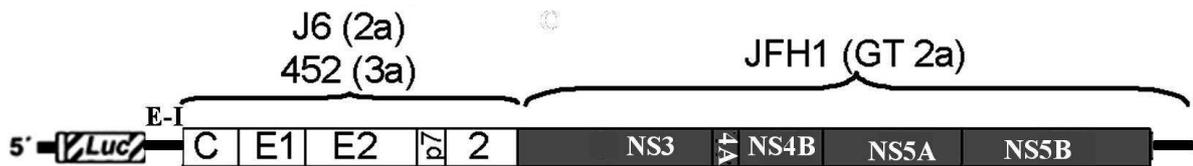


Figure 36: Organisation génétique de Jc1-Luc.

Les extrémités 5' et 3' NTR sont représentées par des lignes noires pleines. La polyprotéine est représentée sous la forme d'une boîte ouverte avec les protéines individuelles séparées par des lignes verticales. Les boîtes noires et blanches de la polyprotéine sont dérivées respectivement J6/CF et de JFH1. Les protéines virales sont exprimées à partir de l'IRES de PEMCV (E-I). Adapté de (Koutsoudakis et al., 2006)

VI.1.6 La banque d'ADNc de foie humain

C'est une banque commerciale (Clontech Paris). Elle est construite à partir des ARNm totaux du foie d'un caucasien âgé de 40 ans et décédé d'un traumatisme. Les ADNc sont clonés dans le vecteur pACT2 puis transformés dans la levure AH109. Le titre est $\geq 10^8$ cfu/ML

VI.1.7 Amorces et plasmides utilisés

Oligonucléotides utilisés dans notre étude

Oligo (OIV)	Séquence	Usage
195	TAATACGACTCACTATAGGCT	Séquençage de SLE1 muté dans pIV1242
1044 bis	TAATACGACTCACTATAGGGC (T7 Promoter sequencing primer)	Séquençage 5' dans pGBK et pGAD
1045 bis	TTTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTC	Séquençage 3' dans pGBK
1231	TCCCCCGGGAAATCTCCAGGCATTGAG	Amplification 5' de SLE1
1248	TCCCCCGGGAATTGCCAGGAC	Amplification 3' de SLE1
1258 bis	GGTGTACTGGCGTATAT	Séquençage SLE1 dans pIIIAMS2-2
1274	AATACCACTACAATGGAT	Séquençage 5' dans pACT2
1275	GGGCATAGAGTGGGTTATTGCAACTTTC CACCCAGTCTTCCCGGC	Mutagenèse SLE1 de JFH1
1276	GCCGGGAAGACTGGGTGGAAAGTTGCA ATAACCACTCTATGCC	Mutagenèse SLE1 de JFH1
1277	CGCAGAAAGCGCCTAGCCATG	Séquençage SLE1 muté de JFH1
1280	GACAGCATCACTTGGCAGCTCGCGCCA CCTTGCCGCACCAGA	Délétion par mutagenèse E1/E2 de JFH1 muté en SLE1
1281	TCTGGTGCGGCAAGGTGGCGCGAGCTG CCAAGTGATGCTGTC	Délétion par mutagenèse E1/E2 de JFH1 muté en SLE1
1282	ACCACTAGCAGCTACATGGTG	Séquençage JFH1 muté et

		déléte E1/E2
1283	GCATTGAGCGGGTTATTGCAACTTTCCA CCCGGTCGTCCTGGC	Mutagenèse SLE1 dans pIIIAMS2-2
1284	GCCAGGACGACCGGGTGGAAAGTTGCA ATAACCCGCTCAATGC	Mutagenèse SLE1 dans pIIIAMS2-2
1286	TCCCCCGGGATCTTAGCCCTAGTC	Amplification 5' de SLII
1287	TCCCCCGGGAGTCATGCGGCTCAC	Amplification 3' de SLII
1288	AGCCCTAGTCACGGCATGGTGTCTTTCC TCCGTGAGCCGCATG	Mutagenèse SLII de JFH1
1289	CATGCGGCTCACGGAGGAAAGACACCA TGCCGTGACTAGGGCT	Mutagenèse SLII de JFH1
1295	GCGGCCGCCCGGGTCGACTC	Séquençage SLII muté dans JFH1
1307	ATTAACCCTCACTAAAG (T3 promoter sequencing primer)	Séquençage SLII mute dans pIV 1242
1311	AAAGAATTCTCCGGATCCTGGCTCCGCG AC	Amplification 5' NS5A JFH1
1313	TACACGGAGGGCCAGTGCGCGGCGGCA CCCCCACGAACTACAAG	Mutagenèse NS5A JFH1 en AAA ⁹⁹
1314	CTTGTAGTTCGTGGGGGGTGGCCGCCGCG CACTGGCCCTCCGTGTA	Mutagenèse NS5A JFH1 en AAA ⁹⁹
1315	GGCCAGTGCGCGCCGAAAGCCCGCCGCG AACTACAAGACCGCCATC	Mutagenèse NS5A JFH1 en AAA ¹⁰¹
1316	GATGGCGGTCTTGTAGTTCGCGGCGGCT TTCGGCGCGCACTGGCC	Mutagenèse NS5A JFH1 en AAA ¹⁰¹
1317	CTCTGGCAATGTCCGCCTGGGCTC	Amplification NS5A JFH1
1318	AAAGTCGACGCAGCACACGGTGGTATC GTC	Amplification 3' NS5A JFH1
1320	ATGCCGATGACCTGCAGAAG	Séquençage interne de ApoE cloné
M13 FW	TGTAAAACGACGGCCAGT	Séquençage 5' de ApoE cloné
RC1	CACGCAGAAAGCGCCTAGCCATGGCGT TAGT	Amplification 5' JC1
RC21	CTCCCGGGGCACTCGCAA GC	Amplification 3' JC1

Constructions plasmidiques utilisés dans notre étude

Plasmide (pIV)	Caratéristiques
1306	SLE1 dans pMS2-2
1310	SLE1 dans pIIIAMS2-2
1363	SLE1 muté dans pJFH1
1364	SLE1 muté dans pIIIAMS2-2
1365	pJFH1 muté dans SLE1 et déléte de E1/E2
1366	SLII muté dans pJFH1
1367	SLII dans pMS2-2
1368	SLII dans pIIIAMS2-2
1369	SLII muté dans pJFH1
1370	pJFH1 muté dans SLII et déléte de E1/E2

1371	pJFH1 muté dans SLE1 et SLII
1372	pJFH1 muté dans SLE1 et SLII et délété de E1/E2
1373	SLII muté dans pIIIAMS2-2
1374	NS5A/JFH1 muté AAA ⁹⁹ dans pGBKT7
1375	NS5A/JFH1 muté AAA ¹⁰² dans pGBKT7
1379	NS5A/JFH1 dans pGBKT7
1380	ApoE dans pGADT7
1381	ApoE dans pcDNA3.1/Hygro(+)
1382	SLII muté dans pIV 1242
1383	SLE1 muté dans pIV 1242
1384	SLE1/II mutés dans pIV1242

VI.2 METHODES

VI.2.1 Culture, Transformation et Manipulation de cellules

VI.2.1.1 Culture

VI.2.1.1.1 Culture de levures et de bactéries

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Les milieux gélosés sont additionnés de 15 g d'agar pour un litre.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées à 37°C majoritairement dans le milieu LB (Luria Broth) contenant pour 1 litre 10 g de bactotryptone, 5 g de NaCl, 5 g d'extrait de levure et 1 mL de NaOH 1M. Le milieu peut être complété d'ampicilline (100 mg/L), de kanamycine (10 mg/L), de tétracycline (10 mg/L) ou de chloramphenicol (25 mg/L) après autoclavage selon le gène de résistance à l'antibiotique du plasmide par lequel elles sont transformées. Accessoirement, les cellules KC8 dérivées de *E. coli* sont cultivées sur un milieu M9 minimum [750 mL d'eau désionisée stérile + 200 mL de sels M9 5X (64 g de Na₂HPO₄, 7H₂O; 15 g de KH₂PO₄; 2,5g de NaCl et 5 g de NH₄Cl dans 1 L d'eau final) + 20 mL d'eau à 20% de glucose] supplémenté d'ampicilline (50 mg/L), de thiamine-HCl (1mM), de MgSO₄ (2 mM), de CaCl₂ (0,1 mM) et de 100 ml de Drop Out Supplement - Leu (10X) pour la sélection des plasmides de la banque d'ADNc.

Les souches de *S. cerevisiae* sont cultivées dans différents milieux à 30°C. Le milieu complet YPG contient 10 g de bacto-yeast extract, 20 g de bactopeptone et 20 g de glucose par litre.

Pour les expériences de triple-hybride, le milieu minimum DOB (Dropout Base) contient 7 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) et 20 g de glucose pour 1 litre. Il est supplémenté de 0,59 g/L de CSM (Complete Supplement Mixture)-ADE-HIS-LEU-URA-TRP contenant tous les aminoacides nécessaires à la croissance des levures à l'exclusion de ceux indiqués (Qbiogene Illkirch). On y ajoute après autoclavage des solutions filtrées sur filtres 0,2 µm d'éléments essentiels (acides aminés et bases) selon la sélection recherchée. La composition des éléments est indiquée dans le tableau ci-dessous. La nomenclature employée indique, pour les milieux minimums sélectifs, les éléments essentiels manquants qui permettront la sélection des marqueurs d'auxotrophie correspondants. Par exemple, le milieu SD/-URA-LEU est un milieu minimum préparé avec la solution décrite ci-dessus dans laquelle l'uracile et la leucine sont absents; il permet de sélectionner les clones exprimant les marqueurs d'auxotrophie *LEU2* et *URA3* contenus dans les vecteurs pACT2 et pIII/MS2-2 respectivement.

Le milieu SD/-URA-LEU-HIS-ADE + 3AT permet de mesurer l'activité des rapporteurs *HIS3* et *LacZ*. Il contient du 3AT (3-aminotriazole), un inhibiteur des voies métaboliques de l'histidine. Le 3AT est ajouté après autoclavage au milieu refroidi. Le niveau d'expression du rapporteur *HIS3* peut être évalué par des tests à des concentrations croissantes en 3AT dans le milieu de culture. Plus l'expression du gène *HIS3* sera élevée, plus grande sera la concentration de 3AT nécessaire pour inhiber la croissance de la souche de levure.

Éléments essentiels	Concentration (µg/mL)
Adénine (ADE)	20
Histidine (HIS)	20
Uracile (HIS)	100
Tryptophane (TRP)	20
Leucine (LEU)	100

Pour les expériences de double-hybride, le milieu minimum SD (Synthetic Defined Media) à base de YNB et de glucose est complété de DOS (Drop Out Supplement) qui apporte tous les acides aminés et bases à l'exclusion de ceux utilisés pour la sélection (Clontech).

VI.2.1.1.2 Culture de cellules de mammifère

Les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's modified minimal essential medium high glucose (DMEM, 4,5 g Glucose/ L PAA) supplémenté de 10% de sérum foetal de boeuf (SFB), de 1% de Glutamax (L-Alanyl-L-Glutamine, Gibco), d'un mélange d'acides aminés non essentiels 1X (Gibco) et de 50 µg/ml de Gentamycine. La densité optimale d'ensemencement est de 5×10^5 cellules par flacon de 75 cm².

VI.2.1.2 Transformation

VI.2.1.2.1 Transformation de bactéries

VI.2.1.2.1.1 Transformation de bactéries thermocompétentes

A 200 µL de bactéries (Souches TG1 et XL1 blue) décongelées sur glace, on ajoute 25 µL de produit de ligation ou 50 ng de préparation plasmidique. L'ensemble est incubé 30 min dans la glace puis placé 90 sec dans un bain-marie à 42°C avant d'être refroidi 5 min dans la glace.

On étale sur une boîte LB + Agar contenant l'antibiotique approprié. On incube à 37°C overnight (O/N).

VI.2.1.2.1.2 Transformation d'E coli KC8 par électroporation

40 µL de bactéries KC8 électrocompétentes (Clontech) décongelées sur glace sont introduites dans une cuvette d'électroporation (0,2 cm) pré-refroidie, on y rajoute 1 à 2 µL de solution plasmidique extraite de levure. On homogénéise précautionneusement. On procède au choc électrique (2,5 kV; 200 Ω; 25 µF), puis les cellules sont aussitôt additionnées de LB sans antibiotique, transférées dans un tube de 15 mL et incubées à 37°C pendant 1 h sous agitation (250 rpm). Les bactéries sont centrifugées à 2500 rpm pendant 5 min, le culot est repris dans 100 µL de LB et étalé sur des boîtes de milieu M9 supplémenté.

VI.2.1.2.2 Transformation de levures

Nous avons suivi le protocole du Yeast Protocols Handbook (Clontech) qui est dérivé de celui élaboré par Gietz *et al.* pour la transformation de levures à l'acétate de lithium (Gietz et al., 1992).

1 mL de YPD(A) estensemencé avec 1 colonie de levure de 2-3 mm de diamètre. On homogénéise au vortex pendant 5 min puis on transfère dans 50 mL de YPD(A) et on incube à 30°C pendant 16-18 h sous agitation (250 rpm). Environ 30 mL de cette pré-culture sont dilués dans 300 mL de YPD(A) de façon à atteindre 0,2-0,3 de densité optique à 600 nm (DO_{600}). On incube à 30°C pendant 3 h sous agitation (230 rpm) pour une absorbance finale de 0,4-0,6. Les levures sont ensuite centrifugées à 1000 x g à température ambiante pendant 5 min. Le culot est repris dans 50 mL d'eau distillée stérile et centrifugé à 1000 x g 5 min à température ambiante. Ce culot est repris dans 1,5 mL de TE/LiAc 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium, pH 7,5) stérile préparé extemporanément. On rajoute stérilement 100 µL de levures compétentes à un tube contenant 0,1 µg du plasmide (de chaque plasmide dans le cas d'une cotransformation simultanée) et 0,1 mg d'ADN entraîneur de sperme de saumon préalablement dénaturé. On mélange au vortex. On ajoute 0,6 mL de solution stérile de PEG/LiAc (PEG 4000 40%, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium, pH 7,5) et on homogénéise vigoureusement au vortex pendant 10 sec puis on incube à 30°C pendant 30 min sous agitation (200 rpm). On additionne 70 µL de DMSO dont on assure le mélange à l'ensemble par inversion précautionneuse. Les levures sont soumises à un choc thermique 15 min à 42°C, puis refroidies 1 à 2 min sur glace avant d'être centrifugées 5 sec à 14000 rpm à température ambiante. Le culot est repris dans 0,5 mL de TE

1X stérile et étalé à raison de 100 μ L par boîte de milieu sélectif approprié. Les boîtes sont incubées 3 à 15 jours à 30°C.

VI.2.1.2.3 Transfection de cellules de mammifère par électroporation

Des monocouches quasi-confluentes de cellules Huh7.5 sont trypsinisées et resuspendues dans du milieu DMEM complet. Les cellules sont ensuite lavées, remises en suspension dans du PBS, comptées et ajustées à $15 \cdot 10^6$ /mL. 10 μ g d'ARN transcrit *in vitro* sont mélangés à 400 μ L de la suspension cellulaire et électroporés immédiatement. Les cellules sont laissées 10 min à température ambiante puis transférées dans 11,6 mL de milieu (DMEM + SFB 10%) avant d'être réparties dans 2 boîtes de culture (10 cm) et incubées à 37°C. Le milieu est changé au bout de 4 heures pour éliminer les cellules mortes et l'ARN non transfecté. Au bout de 48 heures, les cellules sont divisées au 1/6^e ou au 1/8^e selon leur confluence et le milieu changé après 54 heures.

L'électroporation est faite avec le ECM 830 (BTX) à raison de 5 impulsions de 99 milliseconde à 820 V dans des cuvettes de 0,2 cm.

VI.2.2 Utilisation du triple-hybride dans la levure

VI.2.2.1 Principe du triple-hybride

Le principe du triple-hybride est d'isoler des protéines reconnaissant un ARN d'intérêt (dans notre étude SLEI) (**Figure 37**) (SenGupta et al., 1996). Pour cela, cet ARN est fusionné à l'ARN MS2 qui sera reconnu spécifiquement par la protéine de fusion LexA-MS2Coat. LexA est une protéine de liaison à l'ADN (DBD) reconnaissant un site de fixation spécifique sur le promoteur du gène rapporteur. La protéine "proie" reconnaissant l'ARN d'intérêt est fournie sous forme de banque d'ADNc de foie humain fusionné au gène du domaine d'activation de Gal4 ou sous-clonée dans pGADT7 (Dimitrova et al., 2003). Quand une protéine reconnaît l'ARN d'intérêt, les gènes rapporteurs (*HIS3* et *LacZ*) sont activés permettant la croissance des levures sur milieu sélectif.

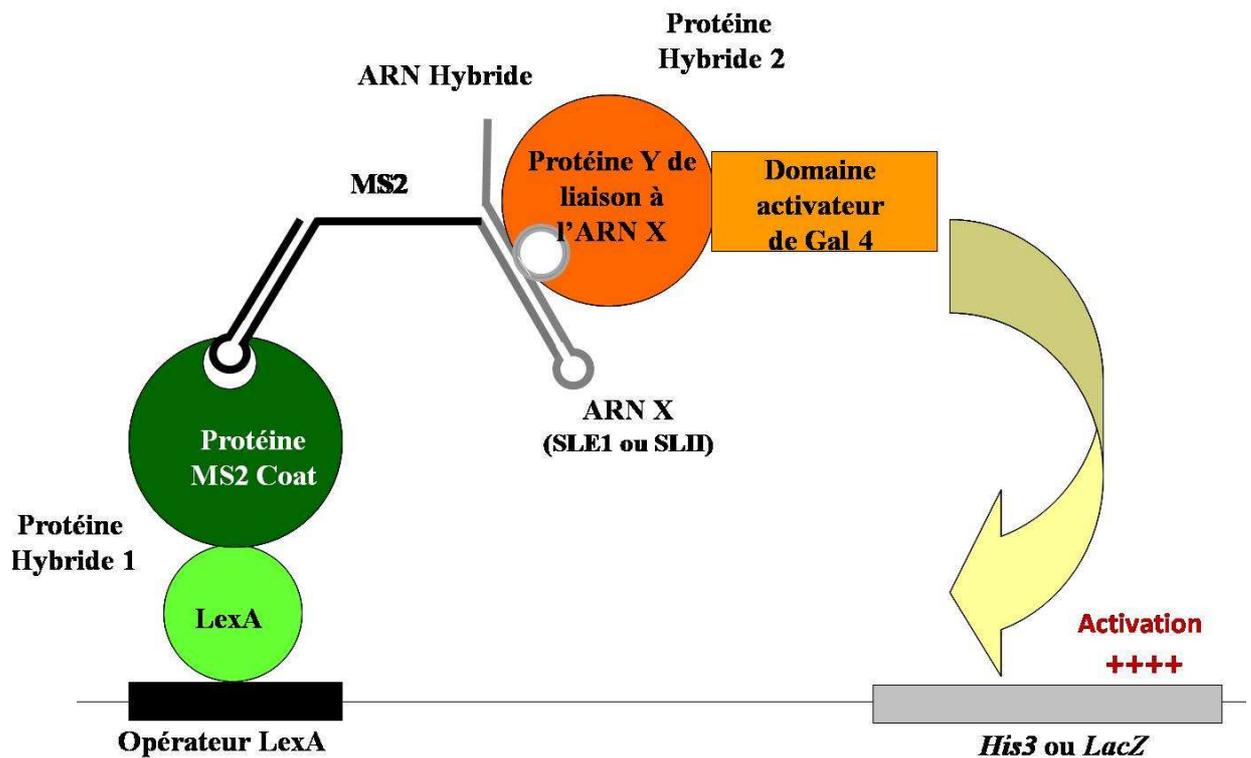


Figure 37: Schéma de la stratégie du triple-hybride pour la détection d'interaction ARN-protéine.

Une protéine hybride comportant un domaine de liaison à l'ADN (LexA) et un domaine de liaison à l'ARN 1 (MS2 Coat) reconnaît l'opérateur LexA. Une seconde protéine hybride contenant un domaine d'activation transcriptionnelle (Gal4 AD) fusionné à la protéine Y de liaison à l'ARN X (SLE1 ou SLII), apportée par la banque d'ADNc ou sous-clonée dans le vecteur pGADT7, permettra l'activation de la transcription des gènes rapporteurs *HIS3* ou *LacZ* après formation d'un transactivateur fonctionnel. Un ARN hybride contenant les sites reconnus par les deux protéines chimériques permettra leur pontage en cas d'interaction entre une protéine de la banque et SLE1. La structure tripartite permet l'expression détectable du gène rapporteur (*HIS3* ou *lacZ*).

VI.2.2.2 Criblage d'une banque d'ADNc

Les banques prétransformées d'ADNc sont criblées par mating (croisement) de 2 souches de levures de signe *a* et *α*. L'une étant YBZ1 qui exprime constitutivement la protéine hybride LexA-MS2 Coat et qui est transformée par le plasmide pIII/MS2-2 portant l'ARN hybride et l'autre, Y187 transformée par pACT2 portant les ADNc de la banque fusionnés au domaine activateur de Gal4. On obtient suite au croisement de ces 2 souches haploïdes, une levure diploïde dans laquelle l'appât est mis en présence de la proie. En cas d'interaction entre l'ARN appât et la protéine proie, le transactivateur reconstitué permettra la pousse de la levure sur un milieu sélectif du fait de la transcription du gène rapporteur *HIS3*. L'interaction

peut aussi être objectivée par la coloration bleue des levures en présence de X-gal suite à la transcription du gène rapporteur *LacZ*.

VI.2.2.2.1 La banque

Du fait du fort tropisme hépatique du VHC, nous avons criblé une banque prétransformée d'ADNc de foie humain (BD MatchmakerTM Pretransformed Libraries; Clontech, Paris). La source étant un mâle caucasien de 40 ans mort d'accident. Cette banque d'ADNc est clonée dans le vecteur pACT2 de levure et prétransformée dans la souche Y187 de *Saccharomyces cerevisiae* après amplification dans la bactérie. Le titre est $\geq 10^8$ cfu/mL.

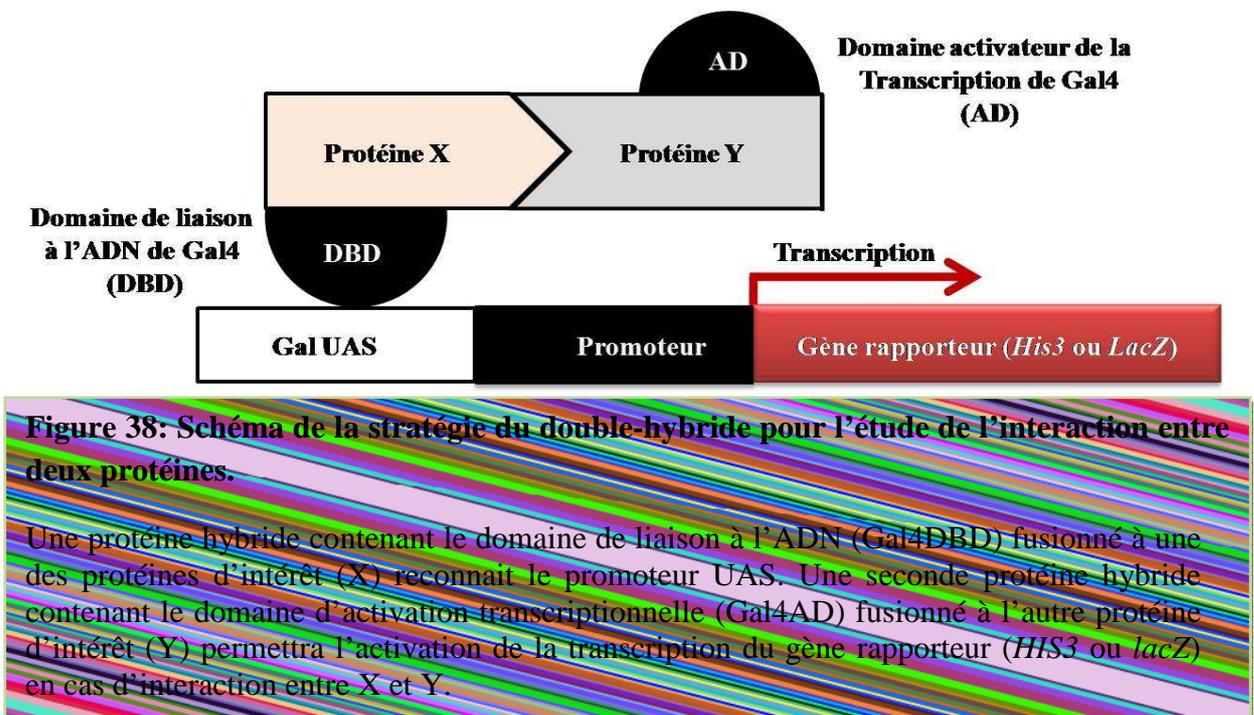
VI.2.2.2.2 Le mating

Une colonie de YBZ1 transformée par le vecteur pIII/MS2-2 portant l'hybride est inoculée dans 50 mL de milieu SD/-URA puis incubée à 30°C pendant 16 à 24 h sous agitation (250-270 rpm). On s'assure d'une $DO_{600} > 0,8$ le jour suivant puis les cellules sont centrifugées à 1000 x g pendant 5 min et le culot repris dans 5 mL de liquide résiduel qu'on combine à 1 mL de la banque décongelé extemporanément et auquel on rajoute 45 mL de 2X YPDA/Kan. On incube à 30°C 20-24 h sous agitation lente (30-50 rpm). Le lendemain, les levures sont centrifugées à 1000 x g pendant 10 min. Les cellules sont resuspendues dans 10 mL d'eau stérile avant d'être étalées à raison de 200 μ L par boîte (150 mm de diamètre) de milieu hautement sélectif SD/-URA-LEU-HIS-ADE (QDO) additionné de 5 mM de 3AT. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 8 à 21 j. Les colonies exploitées sont celles de plus de 2 mm de diamètre qui sont blanches ou légèrement rosées. Un contrôle d'efficacité est fait en étalant 100 μ L de dilution 1:10.000, 1:1.000, 1:100 et 1:10 du produit de croisement sur des boîtes SD/-LEU, SD/-URA, et SD/-URA-LEU. Les clones positifs sont réétalés sur des boîtes SD/-URA-LEU-HIS-ADE + 5 mM de 3AT pour s'assurer que le phénotype est correct. Ceux qui satisfont à cette étape supplémentaire de sélection sont lysés pour extraire l'ADN plasmidique qui est électroporé dans des cellules KC8 et étalé sur un milieu à base de sels M9 supplémenté de thiamine et de SD/-LEU pour la sélection des plasmides de la banque. Après amplification dans les cellules KC8, l'extrait plasmidique est séquencé avec l'amorce Gal4AD sequencing primer (Clontech Paris). La séquence obtenue est identifiée par comparaison avec les séquences d'ADNc répertoriées dans la base de données du NCBI.

VI.2.3 Utilisation du double-hybride dans la levure

VI.2.3.1 Principe du double-hybride

Cette technique permet d'étudier l'interaction entre 2 protéines d'intérêt dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure 38**) (Fields and Song, 1989). Elle consiste à coexprimer deux protéines hybrides dans la levure de souche AH 109: la première est constituée par le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 fusionné à l'une des protéines d'intérêt X qui va constituer l'appât. L'autre protéine hybride consiste en une protéine de fusion entre l'autre protéine d'intérêt Y (la proie) et le domaine d'activation de la transcription du transactivateur Gal4 de levure. L'interaction entre les protéines X et Y va permettre de reconstituer un transactivateur fonctionnel qui va recruter la machinerie de transcription en amont de 2 gènes rapporteurs *HIS3* et *LacZ* et permettre leur expression.



VI.2.3.2 Protocole expérimental

La souche AH109 est cotransformée par les plasmides pGBKT7 portant la fusion Gal4DBD-X et pGADT7 portant la fusion Y-Gal4 par l'acétate de lithium. Les levures doublement transformées sont étalées sur des boîtes SD/-Leu-Trp-Ade-His. Sur ce milieu, ne pousseront que les clones contenant un transactivateur hybride né de la fusion des 2 protéines d'intérêt et capable d'activer le gène rapporteur *HIS3*. Les colonies [His3+] peuvent ensuite être repiquées sur SD/-Leu-Trp-Ade-His + XGal, afin de vérifier par l'apparition de la coloration bleue, l'activation de l'autre gène rapporteur *LacZ*.

VI.2.4 Test en gouttes

Afin de mesurer le niveau d'expression du gène rapporteur *HIS3* au sein de la levure, nous avons utilisé une technique qualitative de test en gouttes. Des gouttes de 50 µL d'une suspension de cellules à tester (DO: 0,7) sont déposées sur des boîtes de milieu sélectif SD/-Leu-Trp-Ade-His (double-hybride) et SD/-Leu-Ura-Ade-His + 3AT (triple-hybride). Ce test est réalisé sur une gamme de concentrations en 3AT de 0 à 30 mM. Ce qui permet d'estimer le niveau d'expression de *HIS3* et, par extrapolation, l'affinité de la protéine pour l'ARN.

VI.2.5 Méthodes relatives à l'ADN

VI.2.5.1 PCR

Les séquences d'ADN d'intérêt ont été amplifiées par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction ou amplification génique exponentielle) à l'aide d'amorces judicieusement choisies et avec l'Elongase (Invitrogen), une ADN polymérase garantissant une haute fidélité de réplication. A 50 ng d'ADN matrice, nous avons rajouté 100 pmol de chaque amorce, 2 µL de dNTP (10 mM), respectivement 2 et 8 µL de tampons A et B (Invitrogen), 1 µL d'élongase et de l'eau qsp 50 µL. Les échantillons ont d'abord été dénaturés 5 min à 94°C, puis ont subi 35 cycles comprenant chacun une dénaturation de l'ADN matriciel 30 sec à 94°C, une hybridation à l'ADN dénaturé 30 sec à 50°C suivie d'une élongation 90 sec à 68°C. Enfin, après 10 min à 68°C le produit de PCR est maintenu à 4°C. L'amplification efficace et la taille des fragments sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose voire d'acrylamide.

VI.2.5.2 Digestion et modification enzymatique de l'ADN

VI.2.5.2.1 Hydrolyse par les enzymes de restriction

La digestion est conduite durant 1 à 2 heures à 37°C sur 1 à 20 µg d'ADN plasmidique additionné d'1 µL d'enzyme par µg d'ADN dans un tampon préconisé par le fournisseur (Invitrogen, Amersham, New England Biolabs, Fermentas, Gibco BRL). La bonne digestion est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose.

VI.2.5.2.2 Déphosphorylation des extrémités 5' des vecteurs linéarisés

Cette étape empêche la recircularisation des vecteurs linéarisés lors de l'étape de ligation. Le produit de digestion est traité par 2 U de phosphatase alcaline de veau (Roche) durant 30 min à 37°C pour les extrémités cohésives (15 min à 37°C suivi de l'ajout d'un autre aliquot de phosphatase alcaline et d'une incubation 45 min à 55°C pour les extrémités franches).

L'enzyme est éliminée, après inactivation 1 h à 65°C, par passage sur des colonnes (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen).

VI.2.5.2.3 Ligation de fragments d'ADN

50 à 100 ng de vecteurs linéarisés et déphosphorylés sont incubés avec le fragment possédant les extrémités compatibles, dans un rapport vecteur/fragment = 1/3 (1/1 pour les ligations d'extrémités franches) en présence de 2 Unités de T4 ADN ligase dans le tampon fourni par le fabricant (Invitrogen). Le milieu est incubé 12 h à température ambiante. 10 à 25 µL de ce mélange peuvent être utilisés directement pour transformer la souche bactérienne.

VI.2.5.3 Extraction et purification d'ADN

VI.2.5.3.1 Minipréparations d'ADN plasmidique

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées 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 12 heures à 37°C. Le lendemain, 1,5 mL de culture bactérienne saturée sont centrifugés pendant 1 min à 13000 rpm. Le culot bactérien est repris dans 100 µL de tampon 1 (Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 10 mM, 100 µg/mL de RNase A). La suspension bactérienne est mélangée à 200 µL de tampon 2 (200 mM NaOH, 1% Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)). 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 200 µL de chloroforme permet la précipitation des protéines. Le mélange est ensuite neutralisé par 150 µL de tampon 3 (acétate de potassium 3 M pH5,5) qui permet préférentiellement la renaturation de l'ADN plasmidique. Après centrifugation 10 min à 4500 rpm, le surnageant contenant le plasmide est précipité par 1 mL d'éthanol absolu. Par centrifugation 30 min à 4500 rpm à 4°C, on obtient un culot d'ADN qui est lavé à l'éthanol 70% et repris dans 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM). L'ADN obtenu est ensuite analysé par digestion enzymatique.

VI.2.5.3.2 Maxipréparations d'ADN plasmidique

Cinq cent mL de milieu LB additionnés de l'antibiotique approprié sontensemencés par des transformants d'*E. coli* puis cultivés pendant une nuit à 37°C sous agitation (200 rpm). Les cellules sont récupérées par centrifugation, resuspendues et soumises à une lyse alcaline. Après neutralisation, l'ADN est fractionné sur une cartouche échangeuse d'anions jetable selon le protocole du Plasmid Maxi Kit (Qiagen). La concentration des plasmides est mesurée

par $A_{260\text{nm}}$. Leur identité est confirmée par différentes digestions par des endonucléases de restriction ou par séquençage.

VI.2.5.3.3 Préparation d'ADN plasmidique de levure

Au culot de levures raclées de boîtes fraîchementensemencées, sont rajoutés 300 μL de billes de verre (Sigma), 200 μL de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, Triton X-100 2%) et 200 μL de mélange Phénol/Chloroforme 1/1. On vortexe 2 min pour lyser les levures puis 200 μL d'eau stérile sont additionnés et l'ensemble est centrifugé 5 min à 14000 rpm. A la phase aqueuse transférée dans un tube eppendorf stérile, de l'acétate de Na 0,3 M final et 2,5 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés. Après centrifugation 10 min à 14000 rpm, le culot d'ADN est repris dans 750 μL d'éthanol 70%, recentrifugé dans les mêmes conditions puis resuspendu dans 50 μL d'eau bisdistillée stérile.

VI.2.5.4 Mutagenèse dirigée

Les mutations ont été effectuées par amplification génique à l'aide du système QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) qui permet la mutation de sites spécifiques d'un plasmide double brin, et qui utilise l'ADN polymérase *Pfu Ultra* répliquant les deux brins de l'ADN avec une haute fidélité à partir de deux amorces oligonucléotidiques synthétiques (d'environ 43 nucléotides) contenant les mutations désirées. Ce procédé rapide génère des mutants avec une efficacité de plus de 80%. Les constructions obtenues par ce procédé ont été séquencées pour vérification.

VI.2.6 Méthodes relatives à l'ARN

VI.2.6.1 Transcription d'ARN in vitro

Les ARNs sont transcrits à partir d'une matrice ADN bicaténaire clonée dans un plasmide et amplifiée dans des bactéries *E. coli*.

VI.2.6.1.1 Préparation de l'ADN matrice pour transcription

10 μg d'ADN plasmidique sont linéarisés par incubation 2 h à 37°C avec 20 U de Xba (New England Biolabs) en présence de NE buffer 2 (10X), de 0,5 μL de BSA (10 mg/mL) et d'eau qsp 50 μL . La digestion est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Des extrémités franches sont générées par incubation 30 min à 30°C du produit de digestion avec 1 μL de Nucléase Mung bean (10 U/ μL) (New England Biolabs) puis l'ADN est purifié au moyen du kit Nucleospin Extract II (MACHEY-NAGEL) et quantifié à A_{260} .

VI.2.6.1.2 Synthèse d'ARN par l'ARN Polymérase du phage T7

Nous avons utilisé le kit MEGAscript T7 (Ambion) pour la transcription des ADN matrices virales linéarisés et purifiés. A 1 µg d'ADN, on rajoute 2 µL de chaque NTP (75 mM), 2 µL de tampon de réaction (10X), 2 µL d'enzyme et de l'eau qsp 20 µL. On incube 4 h à 37°C. A la fin de la réaction, une électrophorèse sur gel de formamide-agarose (1,2 g Agarose; 80 mL eau; MOPS (10X) [200 mM 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid (MOPS), 50 mM acetate de sodium, 10 mM EDTA pH to 7.0 with NaOH] (Sigma) 10 mL; 10 mL formaldéhyde 37%; 20 µL BET) permet de vérifier d'éventuelles dégradations de l'ARN. Le mélange réactionnel obtenu est traité à la DNase I (1 µL à 2 U/µL) 15 min à 37°C puis l'ARN est purifié au moyen du kit RNeasy (Qiagen) et quantifié à A₂₆₀.

VI.2.6.2 RT PCR

Dans un premier temps, QIAamp Viral RNA Mini Kit et RNeasy Mini Kit (Qiagen) sont utilisés pour extraire et purifier les ARNs viraux à partir des surnageants de culture ou des cellules qui ont été préalablement transformées par Jc1.

Dans un second temps, l'ARN est rétrotranscrit et amplifié dans l'amplificateur RG 6000 (Corbett Research) avec le kit sensiMix OneStep (Quantace) en une réaction à 2 étapes. Il contient notamment une rétrotranscriptase et une ADN polymérase haute fidélité dont la spécificité des températures d'activité (resp. 49°C et 95°C) empêchent l'interférence.

A 5 µL d'ARN purifié (~ 100 ng), on ajoute 12,5 µL de SensiMix One-Step; 0,5 µL de MgCl₂; 0,5 µL d'inhibiteur de RNase; 2,25 µL (10 µM) des amorces A221 et S147 (**Cf oligonucléotides, page 120**); 0,25 µL (25 µM) de sonde FAM/JFH1 et 1,75 µL d'eau. Les échantillons sont placés dans le thermocycleur préalablement porté à 49°C pour l'étape de transcription inverse (30 min). Ensuite, l'étape d'activation de l'ADN polymérase est réalisée à 95°C pendant 10 min, inactivant la rétrotranscriptase. L'amplification génique exponentielle se fait au cours de 40 cycles comportant chacun une dénaturation (95°C - 15 sec), une hybridation (60°C - 30 sec) et une élongation (72°C - 15 sec).

VI.2.7 Méthodes relatives aux protéines.

VI.2.7.1 Quantification des protéines totales.

Les protéines totales ont été quantifiées avec le Bio-Rad DC Protein Assay qui est basé sur la réaction des protéines avec une solution alcaline de tartrate de Cuivre et le réactif de Folin. C'est une forme améliorée de la méthode de Lowry de quantification des protéines. On a

d'abord une réaction des protéines avec le cuivre en milieu alcalin puis réduction par le réactif de Folin des protéines traitées par le cuivre avec le développement d'une coloration bleue. On utilise une gamme étalon de 0 à 2 mg de BSA. A 50 µL de protéines à doser, on ajoute 250 µL de réactif A (solution alcaline de tartrate de cuivre) et après homogénéisation 2 mL de réactif B (réactif de Folin dilué). On incube 15 min et l'absorbance est mesurée à 750 nm.

VI.2.7.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par une électrophorèse en gel dénaturant comportant 2 parties: l'une pour la concentration et l'autre pour la séparation. Un volume tampon de charge X2 est ajouté à un volume d'échantillon et l'ensemble est chauffé 3 min à 95°C. Le β-mercaptoéthanol va réduire les ponts disulfures, le SDS va dénaturer les protéines et en se fixant sur les chaînes peptidiques, attribuer une charge nette négative qui est fonction de la taille de la protéine. La séparation se fera donc en fonction de la masse moléculaire. La migration est réalisée pendant 2 à 3 h à 75 V dans du tampon TGS 1X.

Gels de résolution à 12%: 13,6 mL H₂O; 16 mL acrylamide/bisacrylamide 30%; 10 mL Tris-HCl 1,5 M pH8,8; 400 µL SDS 10%; 150 µL Ammonium Persulfate (APS) 10% et 50 µL Tétraméthylethylènediamine (TEMED).

Gels de concentration à 5%: 10 mL H₂O; 3 mL acrylamide/bisacrylamide 30%; 2,25 mL Tris 0,5 M pH6,8; 150 µL SDS 10%; 75 µL APS 10%; 30 µL TEMED.

Tampon de migration TGS 10X: 30 g Tris; 144 g Glycine; 10 g SDS, H₂O qsp 1 L.

VI.2.7.3 Western Blot

Les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide sur une membrane microporeuse de PVDF (Polyvinylidenedifluoride) type Hybond-P (Amersham). La membrane est immergée dans un bain de méthanol 100%, puis lavée à l'eau et équilibrée 5 min dans du tampon de transfert TG 1X. Un sandwich est formé avec, de l'anode vers la cathode, un Scotch Brite[®], 3 feuilles de papier filtre Whatman[®] 3 MM, la membrane, le gel, 3 autres feuilles Whatman[®] 3MM et un Scotch Brite[®]. L'électrotransfert est réalisé en milieu liquide dans un container (tank transfer system, Biorad) 1 h à 300 mA dans le tampon de transfert. La membrane est lavée dans du méthanol, puis de l'eau et équilibrée 5 min dans du tampon PBS-T 1X. Les sites de fixation aspécifiques sont bloqués par incubation de la membrane dans du PBS-T 1X à 5% de lait écrémé une nuit à 4°C sous agitation. La membrane est rincée 3 fois et lavée 20 min dans du PBS-T 1X avant d'être incubée 1 h à température ambiante avec la dilution

appropriée de l'anticorps primaire dans du PBS-T 1X / lait 5% (tampon anticorps). Après 3 lavages avec du PBS-T, la membrane est incubée avec la dilution appropriée de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Amersham) dans le tampon anticorps 1 h à température ambiante. La membrane est lavée comme précédemment et la révélation est réalisée grâce au kit ECL (Enhanced Chemical Luminescence) Western Blotting detection system (Amersham) d'après les indications du fournisseur. La membrane est incubée avec un film d'autoradiographie (Kodak-Biomax) de 1 min à une nuit selon la force du signal et les films développés.

Tampon de transfert 10X: 30g Tris; 144 g Glycine; H₂O qsp 1 L

Tampon PBS-T 10X: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄; H₂O qsp 1 L; ajuster à pH 7,4; 1 mL Tween 20

VI.2.7.4 Mesure de l'activité β -galactosidase

Les niveaux d'expression de la β -galactosidase sont déterminés avec l'ONPG (O-nitrophenyl-D-galactoside) comme substrat. 1,5 mL de culture de levure ayant une A_{600} = 0,5-0,8 est centrifugé à 14000 rpm pendant 30 sec puis le culot est lavé avec 1,5 mL de tampon Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7). Le culot est ensuite repris dans 300 μ L de tampon Z. Pour perméabiliser les levures, les tubes contenant 100 μ L de culot de levures repris dans du tampon Z sont congelés 30 à 60 sec dans de l'azote liquide suivies de 30 à 60 sec de décongélation dans un bain-marie à 37°C. L'opération est répétée 3 fois. Puis 700 μ L de tampon Z à 50 mM de β -mercaptoethanol sont rajoutés à chaque tube dont un témoin contenant 100 μ L de tampon Z. On additionne 160 μ L d'O-nitrophenyl-D-galactoside et le mélange est incubé à 30°C jusqu'au développement d'une coloration jaune. La réaction est stoppée par le rajout de 400 μ L de carbonate de sodium 1 M. Les tubes réactionnels sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min et le surnageant est transféré dans des cuvettes pour la mesure de l'absorbance à 420 nm qui va elle-même permettre la détermination des niveaux d'expression de la β -galactosidase.

VI.2.7.5 Mesure de l'activité luciférase

Les cellules transfectées (ou infectées) sont rincées dans du PBS 1X puis reprises dans 300 μ L (ou 200 μ L) de tampon de lyse (Glo lysis Buffer, Promega). Les lysats cellulaires sont transférés dans un tube eppendorf et les débris culottés par centrifugation. L'activité Luciférase est dosée à partir de 80 μ L de surnageant au moyen du luminomètre Mithras LB 940 (Berthold) en présence de 50 μ L de Bright-Glo Luciferase Assay Buffer qui apporte la

luciférine (substrat de la luciférase). L'activité luciférase est normalisée par rapport à la quantité de protéines totales.

VI.2.7.6 Co-Immunoprécipitation de protéines.

Cette technique permet de mettre en évidence l'interaction de 2 protéines pour laquelle des anticorps sont disponibles. 10^7 cellules Huh7.5.1 électroporées par 10 μg d'ARN Jc1 transcrit in vitro sont reprises dans 12 mL de milieu DMEM complet et réparties dans des plaques à 6 puits à raison de 2 mL/puits. A 72 h post-électroporation, le surnageant est éliminé et les cellules lavées dans du PBS puis lysées dans 300 μL de tampon. A 600 μL de lysat culoté par centrifugation (13000 rpm), on rajoute 60 μL de billes d'agarose couplées aux protéines A et G. On élimine les protéines aspécifiques par rotation à 4°C O/N. Après centrifugation 5 min à température ambiante, on ajoute à 600 μL de surnageant 1 μg d'anticorps dirigé contre l'une des protéines d'intérêt et on incube 2 h à 4°C sous rotation. 60 μL de billes d'A/G Agarose sont ajoutées et incubées 1 h dans les mêmes conditions. Les billes d'agarose sont sédimentées par centrifugation 5 min à 5000 g, rincées 5 fois dans le tampon de lyse puis les billes sont reprises dans 30 μL de bleu Laemmli (SDS 4%, Glycerol 20%, β mercaptoéthanol 10%, bleu de bromophénol 2%, Tris HCl 0,125 M, pH 6,8) et 15 μL sont déposés sur un gel SDS-PAGE. Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, la 2^e protéine d'intérêt est recherchée par Western Blot avec un anticorps spécifique.

VII BIBLIOGRAPHIE

(2000). Heptazyme. *Drug News Perspect* 13, 112.

Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., *et al.* (2007). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *Journal of virology* 81, 8953-8966.

Acosta-Rivero, N., Aguilar, J.C., Musacchio, A., Falcon, V., Vina, A., de la Rosa, M.C., and Morales, J. (2001). Characterization of the HCV core virus-like particles produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical and biophysical research communications* 287, 122-125.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, NY)* 271, 518-520.

Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *The Journal of biological chemistry* 269, 21003-21009.

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

Aiello, A.E., Nguyen, H.O., and Haan, M.N. (2008). C-reactive protein mediates the effect of apolipoprotein E on cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases* 197, 34-41.

Aikawa, T., Kojima, M., Onishi, H., Tamura, R., Fukuda, S., Suzuki, T., Tsuda, F., Okamoto, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1996). HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *Journal of medical virology* 49, 274-278.

Aizaki, H., Lee, K.J., Sung, V.M., Ishiko, H., and Lai, M.M. (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324, 450-461.

Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T.F., Dubuisson, J., and Wakita, T. (2007). CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 81, 5036-5045.

Ali, N., Pruijn, G.J., Kenan, D.J., Keene, J.D., and Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry* 275, 27531-27540.

Ali, N., and Siddiqui, A. (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. *Journal of virology* 69, 6367-6375.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2249-2254.

Ali, N., Tardif, K.D., and Siddiqui, A. (2002). Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *Journal of virology* 76, 12001-12007.

Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J.P., Bureau, C., Sandre, K., Charlet, J.P., Beraud, M., Abbal, M., and Duffaut, M. (2000). Study of host- and virus-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. *Tissue antigens* 56, 154-158.

Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J.P., Charlet, J.P., Selves, J., Puel, J., Pascal, J.P., Duffaut, M., and Abbal, M. (1997). Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 113, 1675-1681.

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

- Alter, M.J., Kruszon-Moran, D., Nainan, O.V., McQuillan, G.M., Gao, F., Moyer, L.A., Kaslow, R.A., and Margolis, H.S. (1999). The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *The New England journal of medicine* *341*, 556-562.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology* *76*, 6919-6928.
- Andre, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., and Lotteau, V. (2005). Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* *25*, 93-104.
- Andreo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P., and Budkowska, A. (2007). Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* *9*, 2445-2456.
- Antonelli, A., Ferri, C., Pampana, A., Fallahi, P., Nesti, C., Pasquini, M., Marchi, S., and Ferrannini, E. (2004). Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med* *117*, 10-13.
- Antonelli, G., Simeoni, E., Turriziani, O., Tesoro, R., Redaelli, A., Roffi, L., Antonelli, L., Pistello, M., and Dianzani, F. (1999). Correlation of interferon-induced expression of MxA mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the response of patients with chronic active hepatitis C to IFN-alpha therapy. *J Interferon Cytokine Res* *19*, 243-251.
- Anwar, A., Ali, N., Tanveer, R., and Siddiqui, A. (2000). Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *The Journal of biological chemistry* *275*, 34231-34235.
- Appel, N., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (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. *Journal of virology* *79*, 3187-3194.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *The Journal of biological chemistry* *281*, 9833-9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS pathogens* *4*, e1000035.
- Ascoli, V., Lo Coco, F., Artini, M., Levrero, M., Martelli, M., and Negro, F. (1998). Extranodal lymphomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Clin Pathol* *109*, 600-609.
- Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T., and Pitha, P.M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 11657-11661.
- Auger, A., Truong, T.Q., Rhainds, D., Lapointe, J., Letarte, F., and Brissette, L. (2001). Low and high density lipoprotein metabolism in primary cultures of hepatic cells from normal and apolipoprotein E knockout mice. *European journal of biochemistry / FEBS* *268*, 2322-2330.
- Bain, C., and Inchauspe, G. (2001). [Dendritic cells and hepatitis C virus]. *Pathol Biol (Paris)* *49*, 464-465.
- Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J.P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., *et al.* (2004). Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of virology* *78*, 10460-10469.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., *et al.* (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 1200-1205.

- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.
- Baril, M., and Brakier-Gingras, L. (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 research* 33, 1474-1486.
- Barman, S., Ali, A., Hui, E.K., Adhikary, L., and Nayak, D.P. (2001). Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res* 77, 61-69.
- Barrett, S., Collins, M., Kenny, C., Ryan, E., Keane, C.O., and Crowe, J. (2003). Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *Journal of medical virology* 71, 212-218.
- Barrett, S., Goh, J., Coughlan, B., Ryan, E., Stewart, S., Cockram, A., O'Keane, J.C., and Crowe, J. (2001). The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. *Gut* 49, 423-430.
- Barrett, S., Ryan, E., and Crowe, J. (1999). Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *Journal of hepatology* 30, 979-983.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. (1994). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *Journal of virology* 68, 5045-5055.
- Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63, 71-180.
- Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2001). Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral research* 52, 1-17.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., *et al.* (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry* 278, 41003-41012.
- Barth, H., Schnober, E.K., Neumann-Haefelin, C., Thumann, C., Zeisel, M.B., Diepolder, H.M., Hu, Z., Liang, T.J., Blum, H.E., Thimme, R., *et al.* (2008). Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *Journal of virology* 82, 3466-3479.
- Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of virology* 80, 10579-10590.
- Barth, H., Ulsenheimer, A., Pape, G.R., Diepolder, H.M., Hoffmann, M., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., Henneke, P., Klein, R., Paranhos-Baccala, G., *et al.* (2005). Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105, 3605-3614.
- Bartosch, B., and Cosset, F.L. (2004). Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. *Curr Gene Ther* 4, 427-443.
- Bartosch, B., and Cosset, F.L. (2006). Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348, 1-12.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine* 197, 633-642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.L. (2003b). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 41624-41630.

- Bassett, S.E., Guerra, B., Brasky, K., Miskovsky, E., Houghton, M., Klimpel, G.R., and Lanford, R.E. (2001). Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* (Baltimore, Md 33, 1479-1487).
- Basu, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (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. *The Journal of general virology* 85, 2299-2306.
- Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., and Liang, T.J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of virology* 72, 3827-3836.
- Baumert, T.F., Vergalla, J., Satoi, J., Thomson, M., Lechmann, M., Herion, D., Greenberg, H.B., Ito, S., and Liang, T.J. (1999). Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117, 1397-1407.
- Bavari, S., Bosio, C.M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A.B., Geisbert, T.W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A., and Aman, M.J. (2002). Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *The Journal of experimental medicine* 195, 593-602.
- Beales, L.P., Rowlands, D.J., and Holzenburg, A. (2001). The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* (New York, NY 7, 661-670).
- Beames, B., Chavez, D., Guerra, B., Notvall, L., Brasky, K.M., and Lanford, R.E. (2000). Development of a primary tamarin hepatocyte culture system for GB virus-B: a surrogate model for hepatitis C virus. *Journal of virology* 74, 11764-11772.
- Bernstein, D.S., Buter, N., Stumpf, C., and Wickens, M. (2002). Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods* 26, 123-141.
- Bhattacharjee, P.S., Neumann, D.M., Foster, T.P., Bouhanik, S., Clement, C., Vinay, D., Thompson, H.W., and Hill, J.M. (2008). Effect of human apolipoprotein E genotype on the pathogenesis of experimental ocular HSV-1. *Exp Eye Res.*
- Bjoro, K., Froland, S.S., Yun, Z., Samdal, H.H., and Haaland, T. (1994). Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *The New England journal of medicine* 331, 1607-1611.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* 80, 6964-6972.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A., and Roingard, P. (2002). Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *Journal of virology* 76, 4073-4079.
- Blanchard, E., Hourieux, C., Brand, D., Ait-Goughoulte, M., Moreau, A., Trassard, S., Sizaret, P.Y., Dubois, F., and Roingard, P. (2003). Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. *Journal of virology* 77, 10131-10138.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., and Rice, C.M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* (New York, NY 290, 1972-1974).
- Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* 76, 13001-13014.
- Blight, K.J., and Rice, C.M. (1997). Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of virology* 71, 7345-7352.
- Bonkovsky, H.L., Poh-Fitzpatrick, M., Pimstone, N., Obando, J., Di Bisceglie, A., Tattrie, C., Tortorelli, K., LeClair, P., Mercurio, M.G., and Lambrecht, R.W. (1998). Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* (Baltimore, Md 27, 1661-1669).

- Bouffard, P., Hayashi, P.H., Acevedo, R., Levy, N., and Zeldis, J.B. (1992). Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *The Journal of infectious diseases* 166, 1276-1280.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., and Lavergne, J.P. (2003). Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *The Journal of biological chemistry* 278, 45785-45792.
- Boulant, S., Douglas, M.W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *The Journal of general virology* 88, 2204-2213.
- Bradley, D.W. (2000). Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 1-23.
- Bradrick, S.S., Walters, R.W., and Gromeier, M. (2006). The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic acids research* 34, 1293-1303.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of biological chemistry* 277, 8130-8139.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13034-13039.
- Bronowicki, J.P., Lorient, M.A., Thiers, V., Grignon, Y., Zignego, A.L., and Brechot, C. (1998). Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 28, 211-218.
- Brooks, D.G., Teyton, L., Oldstone, M.B., and McGavern, D.B. (2005). Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *Journal of virology* 79, 10514-10527.
- Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H., and Lemon, S.M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic acids research* 20, 5041-5045.
- Bukh, J., Apgar, C.L., and Yanagi, M. (1999). Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. *Virology* 262, 470-478.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R.E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M., and Bartenschlager, R. (2002). Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14416-14421.
- Bukh, J., and Purcell, R.H. (2006). A milestone for hepatitis C virus research: a virus generated in cell culture is fully viable in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3500-3501.
- Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., and Baralle, F.E. (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic acids research* 26, 3179-3187.
- Burt, T.D., Agan, B.K., Marconi, V.C., He, W., Kulkarni, H., Mold, J.E., Cavrois, M., Huang, Y., Mahley, R.W., Dolan, M.J., *et al.* (2008). Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8718-8723.

- Cacoub, P., Renou, C., Rosenthal, E., Cohen, P., Loury, I., Loustaud-Ratti, V., Yamamoto, A.M., Camproux, A.C., Hausfater, P., Musset, L., *et al.* (2000). Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine (Baltimore)* 79, 47-56.
- Cai, Z., Zhang, C., Chang, K.S., Jiang, J., Ahn, B.C., Wakita, T., Liang, T.J., and Luo, G. (2005). Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of virology* 79, 13963-13973.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.L., Pawlotsky, J.M., Penin, F., and Dubuisson, J. (2005). Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *Journal of virology* 79, 15331-15341.
- Calvo, D., and Vega, M.A. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *The Journal of biological chemistry* 268, 18929-18935.
- Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *The Journal of biological chemistry* 272, 33068-33076.
- Caronia, S., Taylor, K., Pagliaro, L., Carr, C., Palazzo, U., Petrik, J., O'Rahilly, S., Shore, S., Tom, B.D., and Alexander, G.J. (1999). Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 30, 1059-1063.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of virology* 76, 3720-3730.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier, C., Lorenzo, L., Brulin, B., Cocquerel, L., Belouzard, S., Penin, F., and Dubuisson, J. (2004). Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *The Journal of biological chemistry* 279, 41384-41392.
- Caserta, M.T., McDermott, M.P., Dewhurst, S., Schnabel, K., Carnahan, J.A., Gilbert, L., Lathan, G., Lofthus, G.K., and Hall, C.B. (2004). Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr* 145, 478-484.
- Catanese, M.T., Graziani, R., von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C.M., Cortese, R., *et al.* (2007). High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of virology* 81, 8063-8071.
- Cedazo-Minguez, A. (2007). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of cellular and molecular medicine* 11, 1227-1238.
- Chamberlain, R.W., Adams, N., Saeed, A.A., Simmonds, P., and Elliott, R.M. (1997a). Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *The Journal of general virology* 78 (Pt 6), 1341-1347.
- Chamberlain, R.W., Adams, N.J., Taylor, L.A., Simmonds, P., and Elliott, R.M. (1997b). The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa. *Biochemical and biophysical research communications* 236, 44-49.
- Chang, K.M., Thimme, R., Melpolder, J.J., Oldach, D., Pemberton, J., Moorhead-Loudis, J., McHutchison, J.G., Alter, H.J., and Chisari, F.V. (2001). Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33, 267-276.
- Chang, K.S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *Journal of virology* 81, 13783-13793.

- Chapel, H.M., Christie, J.M., Peach, V., and Chapman, R.W. (2001). Five-year follow-up of patients with primary antibody deficiencies following an outbreak of acute hepatitis C. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 99, 320-324.
- Chen, M., Sallberg, M., Sonnerborg, A., Weiland, O., Mattsson, L., Jin, L., Birkett, A., Peterson, D., and Milich, D.R. (1999). Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 116, 135-143.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine* 3, 866-871.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9578-9582.
- Choi, S.H., and Hwang, S.B. (2006). Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *The Journal of biological chemistry* 281, 7468-7478.
- Choi, S.H., Park, K.J., Ahn, B.Y., Jung, G., Lai, M.M., and Hwang, S.B. (2006). Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Molecular and cellular biology* 26, 3048-3059.
- Cholongitas, E., and Papatheodoridis, G.V. (2008). Review article: novel therapeutic options for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 866-884.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, NY)* 244, 359-362.
- Chung, R.T., and Kaplan, L.M. (1999). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochemical and biophysical research communications* 254, 351-362.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pecheur, E.I., and Dubuisson, J. (2007). Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *Journal of virology* 81, 2372-2381.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1999). The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 73, 2641-2649.
- Cocquerel, L., Kuo, C.C., Dubuisson, J., and Levy, S. (2003). CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *Journal of virology* 77, 10677-10683.
- Cocquerel, L., Meunier, J.C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of virology* 72, 2183-2191.
- Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *The Journal of general virology* 87, 1075-1084.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000). Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of virology* 74, 3623-3633.
- Colin, C., Lanoir, D., Touzet, S., Meyaud-Kraemer, L., Bailly, F., and Trepo, C. (2001). Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *Journal of viral hepatitis* 8, 87-95.
- Collier, A.J., Gallego, J., Klinck, R., Cole, P.T., Harris, S.J., Harrison, G.P., Aboul-Ela, F., Varani, G., and Walker, S. (2002). A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 9, 375-380.

- Congia, M., Clemente, M.G., Dessi, C., Cucca, F., Mazzoleni, A.P., Frau, F., Lampis, R., Cao, A., Lai, M.E., and De Virgiliis, S. (1996). HLA class II genes in chronic hepatitis C virus-infection and associated immunological disorders. *Hepatology* (Baltimore, Md) *24*, 1338-1341).
- Cook, D.N., Pisetsky, D.S., and Schwartz, D.A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature immunology* *5*, 975-979.
- Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C.M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* *10*, 439-449.
- Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P., and Dragic, T. (2004a). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14067-14072.
- Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P., and Dragic, T. (2004b). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 7270-7274.
- Cox, A.L., Mosbrugger, T., Lauer, G.M., Pardoll, D., Thomas, D.L., and Ray, S.C. (2005). Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) *42*, 104-112).
- Cramp, M.E., Carucci, P., Underhill, J., Naoumov, N.V., Williams, R., and Donaldson, P.T. (1998). Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *Journal of hepatology* *29*, 207-213.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., *et al.* (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *The Journal of experimental medicine* *195*, 35-41.
- Crovatto, M., Pozzato, G., Zorat, F., Pussini, E., Nascimben, F., Baracetti, S., Grando, M.G., Mazzaro, C., Reitano, M., Modolo, M.L., *et al.* (2000). Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus. *Haematologica* *85*, 356-361.
- Cucchiari, M., Kammer, A.R., Grabscheid, B., Diepolder, H.M., Gerlach, T.J., Gruner, N., Santantonio, T., Reichen, J., Pape, G.R., and Cerny, A. (2000). Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cellular immunology* *203*, 111-123.
- Dammacco, F., Gatti, P., and Sansonno, D. (1998). Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia, and non-Hodgkin's lymphoma: an emerging picture. *Leuk Lymphoma* *31*, 463-476.
- Dammacco, F., Sansonno, D., Piccoli, C., Racanelli, V., D'Amore, F.P., and Lauletta, G. (2000). The lymphoid system in hepatitis C virus infection: autoimmunity, mixed cryoglobulinemia, and Overt B-cell malignancy. *Semin Liver Dis* *20*, 143-157.
- Darling, J.M., and Wright, T.L. (2004). Immune responses in hepatitis C: is virus or host the problem? *Current opinion in infectious diseases* *17*, 193-198.
- Day, C.L., Lauer, G.M., Robbins, G.K., McGovern, B., Wurcel, A.G., Gandhi, R.T., Chung, R.T., and Walker, B.D. (2002). Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of virology* *76*, 12584-12595.
- De Francesco, R., and Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* *436*, 953-960.
- de Gottardi, A., Paziienza, V., Pugnale, P., Bruttin, F., Rubbia-Brandt, L., Juge-Aubry, C.E., Meier, C.A., Hadengue, A., and Negro, F. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. *Aliment Pharmacol Ther* *23*, 107-114.

- Deforges, S., Evlashev, A., Perret, M., Sodoyer, M., Pouzol, S., Scoazec, J.Y., Bonnaud, B., Diaz, O., Paranhos-Baccala, G., Lotteau, V., *et al.* (2004). Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *The Journal of general virology* *85*, 2515-2523.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M., and Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of virology* *71*, 697-704.
- Deng, L., Nagano-Fujii, M., Tanaka, M., Nomura-Takigawa, Y., Ikeda, M., Kato, N., Sada, K., and Hotta, H. (2006). NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *The Journal of general virology* *87*, 1703-1713.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15623-15628.
- Deutsch, M., Dourakis, S., Manesis, E.K., Gioustozi, A., Hess, G., Horsch, A., and Hadziyannis, S. (1997). Thyroid abnormalities in chronic viral hepatitis and their relationship to interferon alfa therapy. *Hepatology* (Baltimore, Md) *26*, 206-210.
- Dharancy, S., Malapel, M., Perlemuter, G., Roskams, T., Cheng, Y., Dubuquoy, L., Podevin, P., Conti, F., Canva, V., Philippe, D., *et al.* (2005). Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *128*, 334-342.
- Di Marco, S., Rizzi, M., Volpari, C., Walsh, M.A., Narjes, F., Colarusso, S., De Francesco, R., Matassa, V.G., and Sollazzo, M. (2000). Inhibition of the hepatitis C virus NS3/4A protease. The crystal structures of two protease-inhibitor complexes. *The Journal of biological chemistry* *275*, 7152-7157.
- Diepolder, H.M., Gerlach, J.T., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Jung, M.C., Wierenga, E.A., Scholz, S., Santantonio, T., Houghton, M., Southwood, S., *et al.* (1997). Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of virology* *71*, 6011-6019.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of virology* *77*, 5401-5414.
- Ding, L., Derdowski, A., Wang, J.J., and Spearman, P. (2003). Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *Journal of virology* *77*, 1916-1926.
- Domitrovich, A.M., Diebel, K.W., Ali, N., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2005). Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* *335*, 72-86.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.E., Keck, Z., Fong, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., *et al.* (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *The Journal of biological chemistry* *281*, 18285-18295.
- Drummer, H.E., Boo, I., Maerz, A.L., and Pombourios, P. (2006). A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry. *Journal of virology* *80*, 7844-7853.
- Drummer, H.E., Maerz, A., and Pombourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* *546*, 385-390.
- Dubuisson, J. (2007). Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* *13*, 2406-2415.
- Dubuisson, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* *12*, 517-523.
- Dumont, S., Cheng, W., Serebrov, V., Beran, R.K., Tinoco, I., Jr., Pyle, A.M., and Bustamante, C. (2006). RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* *439*, 105-108.

- Dumoulin, F.L., von dem Bussche, A., Li, J., Khamzina, L., Wands, J.R., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2003). Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 305, 260-266.
- Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Moradpour, D., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *The Journal of biological chemistry* 273, 32088-32095.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology* 76, 5974-5984.
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Ebel, J.P., and Ehresmann, B. (1987). Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic acids research* 15, 9109-9128.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J.S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of virology* 78, 11288-11295.
- El-Hage, N., and Luo, G. (2003). Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *The Journal of general virology* 84, 2761-2769.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *Journal of virology* 78, 11393-11400.
- Elliot, L.N., Lloyd, A.R., Ziegler, J.B., and Ffrench, R.A. (2006). Protective immunity against hepatitis C virus infection. *Immunology and cell biology* 84, 239-249.
- Ellis, M., Rathaus, M., Amiel, A., Manor, Y., Klein, A., and Lishner, M. (1995). Monoclonal lymphocyte proliferation and bcl-2 rearrangement in essential mixed cryoglobulinaemia. *European journal of clinical investigation* 25, 833-837.
- Erdtmann, L., Franck, N., Lerat, H., Le Seyec, J., Gilot, D., Cannie, I., Gripon, P., Hibner, U., and Guguen-Guillouzo, C. (2003). The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 18256-18264.
- Eren, R., Landstein, D., Terkieltaub, D., Nussbaum, O., Zauberman, A., Ben-Porath, J., Gopher, J., Buchnick, R., Kovjazin, R., Rosenthal-Galili, Z., *et al.* (2006). Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *Journal of virology* 80, 2654-2664.
- Erickson, A.L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A.L., and Walker, C.M. (2001). The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15, 883-895.
- Evans, M.J., Rice, C.M., and Goff, S.P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13038-13043.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.
- Ezelle, H.J., Markovic, D., and Barber, G.N. (2002). Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *Journal of virology* 76, 12325-12334.
- Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of virology* 68, 3753-3760.

- Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1995). An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *Journal of virology* *69*, 1769-1777.
- Fan, Z., Yang, Q.R., Twu, J.S., and Sherker, A.H. (1999). Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *Journal of medical virology* *59*, 131-134.
- Fang, J.W., and Moyer, R.W. (2000). The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *Journal of hepatology* *33*, 632-639.
- Fanning, L.J., Kenny-Walsh, E., and Shanahan, F. (2004). Persistence of hepatitis C virus in a white population: associations with human leukocyte antigen class 1. *Human immunology* *65*, 745-751.
- Fanning, L.J., Levis, J., Kenny-Walsh, E., Wynne, F., Whelton, M., and Shanahan, F. (2000). Viral clearance in hepatitis C (1b) infection: relationship with human leukocyte antigen class II in a homogeneous population. *Hepatology (Baltimore, Md)* *31*, 1334-1337.
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M., and Purcell, R.H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 7792-7796.
- Farci, P., and Purcell, R.H. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* *20*, 103-126.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 15394-15399.
- Fargion, S., Piperno, A., Cappellini, M.D., Sampietro, M., Fracanzani, A.L., Romano, R., Caldarelli, R., Marcelli, R., Vecchi, L., and Fiorelli, G. (1992). Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology (Baltimore, Md)* *16*, 1322-1326.
- Fernandez-Soto, L., Gonzalez, A., Escobar-Jimenez, F., Vazquez, R., Ocete, E., Olea, N., and Salmeron, J. (1998). Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med* *158*, 1445-1448.
- Fernandez, M., Quiroga, J.A., Martin, J., Herrero, M., Pardo, M., Horisberger, M.A., and Carreno, V. (1999). In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. *The Journal of infectious diseases* *180*, 262-267.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J.D., Lavergne, J.P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., and Bain, C. (2007). Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *The Journal of general virology* *88*, 1149-1162.
- Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (2002). Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* *277*, 17377-17380.
- Fletcher, S.P., Ali, I.K., Kaminski, A., Digard, P., and Jackson, R.J. (2002). The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes. *RNA (New York, NY)* *8*, 1558-1571.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., and McKeating, J.A. (1999a). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *Journal of virology* *73*, 6235-6244.

- Flint, M., Thomas, J.M., Maidens, C.M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W.S., and McKeating, J.A. (1999b). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of virology* 73, 6782-6790.
- Folgori, A., Spada, E., Pezzanera, M., Ruggeri, L., Mele, A., Garbuglia, A.R., Perrone, M.P., Del Porto, P., Piccolella, E., Cortese, R., *et al.* (2006). Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. *Gut* 55, 1012-1019.
- Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Chisari, F.V., and Bukh, J. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13318-13323.
- Forton, D.M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S.D., and Thomas, H.C. (2004a). Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *Journal of virology* 78, 5170-5183.
- Forton, D.M., Thomas, H.C., and Taylor-Robinson, S.D. (2004b). Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metabolic brain disease* 19, 383-391.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Johnson, C.L., Wang, C., Fish, P.M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., *et al.* (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2986-2991.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S.M., and Gale, M., Jr. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science (New York, NY)* 300, 1145-1148.
- Franck, N., Le Seyec, J., Guguen-Guillouzo, C., and Erdtmann, L. (2005). Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *Journal of virology* 79, 2700-2708.
- Frick, D.N. (2007). The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Current issues in molecular biology* 9, 1-20.
- Frick, D.N., Rypma, R.S., Lam, A.M., and Gu, B. (2004). The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *The Journal of biological chemistry* 279, 1269-1280.
- Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology* 76, 5326-5338.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of virology* 79, 380-392.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of virology* 75, 12047-12057.
- Fukushi, S., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Oya, A., and Katayama, K. (1997). The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 71, 1662-1666.
- Fukushi, S., Okada, M., Kageyama, T., Hoshino, F.B., Nagai, K., and Katayama, K. (2001a). Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res* 73, 67-79.
- Fukushi, S., Okada, M., Stahl, J., Kageyama, T., Hoshino, F.B., and Katayama, K. (2001b). Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *The Journal of biological chemistry* 276, 20824-20826.

- Fuller, M.J., Hildeman, D.A., Sabbaj, S., Gaddis, D.E., Tebo, A.E., Shang, L., Goepfert, P.A., and Zajac, A.J. (2005). Cutting edge: emergence of CD127^{high} functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol* *174*, 5926-5930.
- Gale, M., Jr., Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Molecular and cellular biology* *18*, 5208-5218.
- Gale, M., Jr., and Foy, E.M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* *436*, 939-945.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* *230*, 217-227.
- Galun, E., Burakova, T., Ketzinel, M., Lubin, I., Shezen, E., Kahana, Y., Eid, A., Ilan, Y., Rivkind, A., Pizov, G., *et al.* (1995). Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *The Journal of infectious diseases* *172*, 25-30.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.W., and Lai, M.M. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of virology* *78*, 3480-3488.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4498-4503.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of virology* *82*, 2120-2129.
- Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* *117*, 933-941.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2002a). Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of medical virology* *68*, 206-215.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2002b). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* *292*, 162-168.
- Gerotto, M., Dal Pero, F., Bortoletto, G., Ferrari, A., Pistis, R., Sebastiani, G., Fagioli, S., Realdon, S., and Alberti, A. (2006). Hepatitis C minimal residual viremia (MRV) detected by TMA at the end of Peg-IFN plus ribavirin therapy predicts post-treatment relapse. *Journal of hepatology* *44*, 83-87.
- Giannini, C., and Brechot, C. (2003). Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ* *10 Suppl 1*, S27-38.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research* *20*, 1425.
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of lipid research* *42*, 1474-1482.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.L., Montpellier, C., and Dubuisson, J. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of virology* *79*, 8400-8409.
- Goffard, A., and Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* *85*, 295-301.

- Goh, P.Y., Tan, Y.J., Lim, S.P., Tan, Y.H., Lim, S.G., Fuller-Pace, F., and Hong, W. (2004). Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *Journal of virology* 78, 5288-5298.
- Gontarek, R.R., Gutshall, L.L., Herold, K.M., Tsai, J., Sathe, G.M., Mao, J., Prescott, C., and Del Vecchio, A.M. (1999). hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic acids research* 27, 1457-1463.
- Gonzalez-Carmona, M.A., Schussler, S., Serwe, M., Alt, M., Ludwig, J., Sproat, B.S., Steigerwald, R., Hoffmann, P., Quasdorff, M., Schildgen, O., *et al.* (2006). Hammerhead ribozymes with cleavage site specificity for NUH and NCH display significant anti-hepatitis C viral effect in vitro and in recombinant HepG2 and CCL13 cells. *Journal of hepatology* 44, 1017-1025.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 1-44.
- Grabowska, A.M., Lechner, F., Klenerman, P., Tighe, P.J., Ryder, S., Ball, J.K., Thomson, B.J., Irving, W.L., and Robins, R.A. (2001). Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *European journal of immunology* 31, 2388-2394.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science (New York, NY)* 302, 659-662.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of virology* 67, 1385-1395.
- Gramenzi, A., Andreone, P., Loggi, E., Foschi, F.G., Cursaro, C., Margotti, M., Biselli, M., and Bernardi, M. (2005). Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis* 12, 525-530.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I., and McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *The Journal of general virology* 86, 1415-1421.
- Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D., and Harris, M. (2005). Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *Journal of virology* 79, 15525-15536.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., and Rowlands, D.J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535, 34-38.
- Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M., and Rowlands, D.J. (2004). A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *The Journal of general virology* 85, 451-461.
- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J.S., Leroux-Roels, G., *et al.* (2007). Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of virology* 81, 3162-3169.
- Gruener, N.H., Lechner, F., Jung, M.C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., Walker, B., Sullivan, J., Phillips, R., Pape, G.R., *et al.* (2001). Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *Journal of virology* 75, 5550-5558.
- Gruner, N.H., Gerlach, T.J., Jung, M.C., Diepolder, H.M., Schirren, C.A., Schraut, W.W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiari, M., *et al.* (2000). Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *The Journal of infectious diseases* 181, 1528-1536.
- Gumbiner, B.M. (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 123, 1631-1633.

- Guo, J.T., Bichko, V.V., and Seeger, C. (2001). Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *Journal of virology* 75, 8516-8523.
- Haberstroh, A., Schnober, E.K., Zeisel, M.B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H.E., Cosset, F.L., Koutsoudakis, G., Bartschlager, R., Union, A., *et al.* (2008). Neutralizing Host Responses in Hepatitis C Virus Infection Target Viral Entry at Postbinding Steps and Membrane Fusion. *Gastroenterology*.
- Haddad, J., Deny, P., Munz-Gotheil, C., Ambrosini, J.C., Trinchet, J.C., Pateron, D., Mal, F., Callard, P., and Beaugrand, M. (1992). Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 339, 321-323.
- Hahm, B., Cho, O.H., Kim, J.E., Kim, Y.K., Kim, J.H., Oh, Y.L., and Jang, S.K. (1998a). Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L. *FEBS Lett* 425, 401-406.
- Hahm, B., Kim, Y.K., Kim, J.H., Kim, T.Y., and Jang, S.K. (1998b). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Journal of virology* 72, 8782-8788.
- Haller, A.A., Lauer, G.M., King, T.H., Kemmler, C., Fiolkoski, V., Lu, Y., Bellgrau, D., Rodell, T.C., Apelian, D., Franzusoff, A., *et al.* (2007). Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins. *Vaccine* 25, 1452-1463.
- Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M.M., Miyamura, T., *et al.* (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of virology* 79, 13473-13482.
- Hardy, R.W., Marcotrigiano, J., Blight, K.J., Majors, J.E., and Rice, C.M. (2003). Hepatitis C virus RNA synthesis in a cell-free system isolated from replicon-containing hepatoma cells. *Journal of virology* 77, 2029-2037.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., *et al.* (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *Journal of virology* 82, 5007-5020.
- He, Y., King, M.S., Kempf, D.J., Lu, L., Lim, H.B., Krishnan, P., Kati, W., Middleton, T., and Molla, A. (2008). Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1101-1110.
- He, Y., Nakao, H., Tan, S.L., Polyak, S.J., Neddermann, P., Vijaysri, S., Jacobs, B.L., and Katze, M.G. (2002). Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of virology* 76, 9207-9217.
- Helle, F., and Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 100-112.
- Helle, F., Wychowski, C., Vu-Dac, N., Gustafson, K.R., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *The Journal of biological chemistry* 281, 25177-25183.
- Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (1999). Translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of viral hepatitis* 6, 79-87.
- Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15, 1593-1612.
- Heo, T.H., Chang, J.H., Lee, J.W., Fong, S.K., Dubuisson, J., and Kang, C.Y. (2004). Incomplete humoral immunity against hepatitis C virus is linked with distinct recognition of putative multiple receptors by E2 envelope glycoprotein. *J Immunol* 173, 446-455.
- Higginbottom, A., Quinn, E.R., Kuo, C.C., Flint, M., Wilson, L.H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P.N., McKeating, J.A., and Levy, S. (2000). Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of virology* 74, 3642-3649.

- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 10773-10777.
- Hirano, M., Kaneko, S., Yamashita, T., Luo, H., Qin, W., Shirota, Y., Nomura, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2003). Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *The Journal of biological chemistry* *278*, 5109-5115.
- Hohler, T., Gerken, G., Notghi, A., Knolle, P., Lubjuhn, R., Taheri, H., Schneider, P.M., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Rittner, C. (1997). MHC class II genes influence the susceptibility to chronic active hepatitis C. *Journal of hepatology* *27*, 259-264.
- Hollinger, F.B., Gitnick, G.L., Aach, R.D., Szmunes, W., Mosley, J.W., Stevens, C.E., Peters, R.L., Weiner, J.M., Werch, J.B., and Lander, J.J. (1978). Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* *10*, 60-68.
- Honda, M., Brown, E.A., and Lemon, S.M. (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA (New York, NY)* *2*, 955-968.
- Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B., and Wickens, M. (2005). RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA (New York, NY)* *11*, 227-233.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 7271-7276.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 5848-5853.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* *280*, 36417-36428.
- Huang, M.J., Tsai, S.L., Huang, B.Y., Sheen, I.S., Yeh, C.T., and Liaw, Y.F. (1999). Prevalence and significance of thyroid autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: a prospective controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)* *50*, 503-509.
- Huang, Z.H., Gu, D., Lange, Y., and Mazzone, T. (2003). Expression of scavenger receptor BI facilitates sterol movement between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in macrophages. *Biochemistry* *42*, 3949-3955.
- Hugle, T., and Cerny, A. (2003). Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* *13*, 361-371.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* *284*, 70-81.
- Ikeda, M., Abe, K., Yamada, M., Dansako, H., Naka, K., and Kato, N. (2006). Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology (Baltimore, Md)* *44*, 117-125.
- Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zauberman, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A., Litchi, A., *et al.* (2002). The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *The Journal of infectious diseases* *185*, 153-161.
- Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M.P., and Schuster, C. (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. *The Journal of general virology* *84*, 1549-1557.

- Ishii, N., Watashi, K., Hishiki, T., Goto, K., Inoue, D., Hijikata, M., Wakita, T., Kato, N., and Shimotohno, K. (2006). Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *Journal of virology* *80*, 4510-4520.
- Isoyama, T., Kamoshita, N., Yasui, K., Iwai, A., Shiroki, K., Toyoda, H., Yamada, A., Takasaki, Y., and Nomoto, A. (1999). Lower concentration of La protein required for internal ribosome entry on hepatitis C virus RNA than on poliovirus RNA. *The Journal of general virology* *80* (Pt 9), 2319-2327.
- Ito, T., and Lai, M.M. (1997). Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *Journal of virology* *71*, 8698-8706.
- Ito, T., and Lai, M.M. (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*, 288-296.
- Ito, T., Tahara, S.M., and Lai, M.M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *Journal of virology* *72*, 8789-8796.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *Journal of virology* *76*, 13088-13093.
- Izumi, T., Sasaki, R., Tsunoda, S., Akutsu, M., Okamoto, H., and Miura, Y. (1997). B cell malignancy and hepatitis C virus infection. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 516-518.
- Jarczak, D., Korf, M., Beger, C., Manns, M.P., and Kruger, M. (2005). Hairpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *Febs J* *272*, 5910-5922.
- Jennings, T.A., Chen, Y., Sikora, D., Harrison, M.K., Sikora, B., Huang, L., Jankowsky, E., Fairman, M.E., Cameron, C.E., and Raney, K.D. (2008). RNA unwinding activity of the hepatitis C virus NS3 helicase is modulated by the NS5B polymerase. *Biochemistry* *47*, 1126-1135.
- Jopling, C.L., Norman, K.L., and Sarnow, P. (2006). Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *71*, 369-376.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *The Journal of general virology* *75* (Pt 7), 1755-1760.
- Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S., and Magnus, L.O. (2002). A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of virology* *76*, 4034-4043.
- Kalliampakou, K.I., Kalamvoki, M., and Mavromara, P. (2005). Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation. *The Journal of general virology* *86*, 1015-1025.
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A., and Chisari, F.V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of virology* *81*, 374-383.
- Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 2561-2566.
- Kato, J., Kato, N., Yoshida, H., Ono-Nita, S.K., Shiratori, Y., and Omata, M. (2002). Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *Journal of medical virology* *66*, 187-199.
- Kato, N. (2001). Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* *55*, 133-159.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* *125*, 1808-1817.

- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of medical virology* 64, 334-339.
- Katze, M.G., He, Y., and Gale, M., Jr. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature reviews* 2, 675-687.
- Keck, Z.Y., Op De Beeck, A., Hadlock, K.G., Xia, J., Li, T.K., Dubuisson, J., and Fong, S.K. (2004). Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *Journal of virology* 78, 9224-9232.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., *et al.* (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science (New York, NY)* 305, 872-874.
- Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA (New York, NY)* 7, 194-206.
- Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.K., Park, J.H., and Jang, S.K. (2007). An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *Journal of virology* 81, 3852-3865.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., and Caron, P.R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89-100.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., *et al.* (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87, 343-355.
- Klein, K.C., Polyak, S.J., and Lingappa, J.R. (2004). Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *Journal of virology* 78, 9257-9269.
- Knapp, S., Hennig, B.J., Frodsham, A.J., Zhang, L., Hellier, S., Wright, M., Goldin, R., Hill, A.V., Thomas, H.C., and Thursz, M.R. (2003a). Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 55, 362-369.
- Knapp, S., Yee, L.J., Frodsham, A.J., Hennig, B.J., Hellier, S., Zhang, L., Wright, M., Chiamonte, M., Graves, M., Thomas, H.C., *et al.* (2003b). Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes and immunity* 4, 411-419.
- Knobler, H., Schihmanter, R., Zifroni, A., Fenakel, G., and Schattner, A. (2000). Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 75, 355-359.
- Koch, J.O., and Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Journal of virology* 73, 7138-7146.
- Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2000). An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Journal of virology* 74, 6242-6250.
- Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of virology* 70, 3363-3371.
- Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of virology* 74, 2046-2051.
- Komurian-Pradel, F., Paranhos-Baccala, G., Sodoyer, M., Chevallier, P., Mandrand, B., Lotteau, V., and Andre, P. (2001). Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods* 95, 111-119.

- Komurian-Pradel, F., Rajoharison, A., Berland, J.L., Khouri, V., Perret, M., Van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F., and Paranhos-Baccala, G. (2004). Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md 40, 900-909).
- Konan, K.V., Giddings, T.H., Jr., Ikeda, M., Li, K., Lemon, S.M., and Kirkegaard, K. (2003). Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *Journal of virology* 77, 7843-7855.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *Journal of virology* 81, 588-598.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of virology* 80, 5308-5320.
- Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *Journal of virology* 75, 4614-4624.
- Kuang, W.F., Lin, Y.C., Jean, F., Huang, Y.W., Tai, C.L., Chen, D.S., Chen, P.J., and Hwang, L.H. (2004). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase activity is modulated by the two domains of NS3 and NS4A. *Biochemical and biophysical research communications* 317, 211-217.
- Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S.M., and Watowich, S.J. (2001). Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* 75, 2119-2129.
- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E., *et al.* (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* (New York, NY 244, 362-364).
- Kuzushita, N., Hayashi, N., Moribe, T., Katayama, K., Kanto, T., Nakatani, S., Kaneshige, T., Tatsumi, T., Ito, A., Mochizuki, K., *et al.* (1998). Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology* (Baltimore, Md 27, 240-244).
- Lai, M.M., and Ware, C.F. (2000). Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 117-134.
- Lai, V.C., Dempsey, S., Lau, J.Y., Hong, Z., and Zhong, W. (2003). In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *Journal of virology* 77, 2295-2300.
- Lamonaca, V., Missale, G., Urbani, S., Pilli, M., Boni, C., Mori, C., Sette, A., Massari, M., Southwood, S., Bertoni, R., *et al.* (1999). Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. *Hepatology* (Baltimore, Md 30, 1088-1098).
- Lanford, R.E., Guerra, B., Lee, H., Averett, D.R., Pfeiffer, B., Chavez, D., Notvall, L., and Bigger, C. (2003). Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Journal of virology* 77, 1092-1104.
- Laporte, J., Bain, C., Maurel, P., Inchauspe, G., Agut, H., and Cahour, A. (2003). Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101, 52-57.
- Laskus, T., Radkowski, M., Bednarska, A., Wilkinson, J., Adair, D., Nowicki, M., Nikolopoulou, G.B., Vargas, H., and Rakela, J. (2002a). Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *Journal of virology* 76, 10064-10068.

- Laskus, T., Radkowski, M., Wilkinson, J., Vargas, H., and Rakela, J. (2002b). The origin of hepatitis C virus reinfecting transplanted livers: serum-derived versus peripheral blood mononuclear cell-derived virus. *The Journal of infectious diseases* *185*, 417-421.
- Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* *369*, 648-652.
- Lauer, G.M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A.Y., Day, C.L., Robbins, G.K., Casson, D.R., Reiser, M., *et al.* (2004). High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *127*, 924-936.
- Lavie, M., Goffard, A., and Dubuisson, J. (2007). Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current issues in molecular biology* *9*, 71-86.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M., *et al.* (2005a). Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *Journal of virology* *79*, 6023-6034.
- Lavillette, D., Pecheur, E.I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F., and Cosset, F.L. (2007). Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *Journal of virology* *81*, 8752-8765.
- Lavillette, D., Tarr, A.W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A.H., Dubuisson, J., Ball, J.K., and Cosset, F.L. (2005b). Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* *41*, 265-274.
- Le Pogam, S., Sessaadri, A., Kosaka, A., Chiu, S., Kang, H., Hu, S., Rajyaguru, S., Symons, J., Cammack, N., and Najera, I. (2008). Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother* *61*, 1205-1216.
- Lechmann, M., Murata, K., Satoi, J., Vergalla, J., Baumert, T.F., and Liang, T.J. (2001). Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* *34*, 417-423.
- Lechmann, M., Schneider, E.M., Giers, G., Kaiser, R., Dumoulin, F.L., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (1999). Increased frequency of the HLA-DR15 (B1*15011) allele in German patients with self-limited hepatitis C virus infection. *European journal of clinical investigation* *29*, 337-343.
- Lechner, F., Gruener, N.H., Urbani, S., Uggeri, J., Santantonio, T., Kammer, A.R., Cerny, A., Phillips, R., Ferrari, C., Pape, G.R., *et al.* (2000a). CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European journal of immunology* *30*, 2479-2487.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. (2000b). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *The Journal of experimental medicine* *191*, 1499-1512.
- Lee, H., Shin, H., Wimmer, E., and Paul, A.V. (2004). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology* *78*, 10865-10877.
- Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M.A., Trepo, C., and Inchauspe, G. (1998). In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* *91*, 3841-3849.
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., and Weber, P.C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* *6*, 937-943.
- Levin, M.K., Gurjar, M., and Patel, S.S. (2005). A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 429-435.

- Levy, S., and Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews* 5, 136-148.
- Li, D., Takyar, S.T., Lott, W.B., and Gowans, E.J. (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. *The Journal of general virology* 84, 815-825.
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr., and Lemon, S.M. (2005a). Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 16739-16747.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr., and Lemon, S.M. (2005b). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2992-2997.
- Li, X.D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005c). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17717-17722.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., McCourt, D.W., and Rice, C.M. (1994a). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of virology* 68, 5063-5073.
- Lin, C., Pragai, B.M., Grakoui, A., Xu, J., and Rice, C.M. (1994b). Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *Journal of virology* 68, 8147-8157.
- Lin, C., Thomson, J.A., and Rice, C.M. (1995). A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *Journal of virology* 69, 4373-4380.
- Lin, C.C., Luu, T., Lourenco, D., Yeh, L.T., and Lau, J.Y. (2003). Absorption, pharmacokinetics and excretion of levovirin in rats, dogs and cynomolgus monkeys. *J Antimicrob Chemother* 51, 93-99.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P.M., and Hiscott, J. (1999). Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Molecular and cellular biology* 19, 959-966.
- Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., Wilkinson, P., Julkunen, I., Vitour, D., Meurs, E., *et al.* (2006). Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *Journal of virology* 80, 6072-6083.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., *et al.* (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science (New York, NY)* 309, 623-626.
- Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *Journal of virology* 81, 8905-8918.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938.
- Liu, Q., Tackney, C., Bhat, R.A., Prince, A.M., and Zhang, P. (1997). Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *Journal of virology* 71, 657-662.
- Lo, S.Y., Selby, M.J., and Ou, J.H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *Journal of virology* 70, 5177-5182.

- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 10149-10154.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Journal of virology* *77*, 3007-3019.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science (New York, NY)* *285*, 110-113.
- Lok, A.S., Chien, D., Choo, Q.L., Chan, T.M., Chiu, E.K., Cheng, I.K., Houghton, M., and Kuo, G. (1993). Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology (Baltimore, Md)* *18*, 497-502.
- Lonardo, A., Adinolfi, L.E., Loria, P., Carulli, N., Ruggiero, G., and Day, C.P. (2004). Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* *126*, 586-597.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* *442*, 831-835.
- Lorenzo, L.J., Duenas-Carrera, S., Falcon, V., Acosta-Rivero, N., Gonzalez, E., de la Rosa, M.C., Menendez, I., and Morales, J. (2001). Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* *281*, 962-965.
- Louvet, O., Doignon, F., and Crouzet, M. (1997). Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *BioTechniques* *23*, 816-818, 820.
- Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., and Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *The Journal of biological chemistry* *279*, 32035-32045.
- Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., *et al.* (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *The Journal of biological chemistry* *278*, 20358-20366.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., and Persson, M.A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of virology* *77*, 5428-5438.
- Lunel, F., Musset, L., Cacoub, P., Frangeul, L., Cresta, P., Perrin, M., Grippon, P., Hoang, C., Valla, D., Piette, J.C., *et al.* (1994). Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology* *106*, 1291-1300.
- Luo, G. (1999). Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* *256*, 105-118.
- Lupberger, J., Brino, L., and Baumert, T.F. (2008). RNAi: a powerful tool to unravel hepatitis C virus-host interactions within the infectious life cycle. *Journal of hepatology* *48*, 523-525.
- Lytle, J.R., Wu, L., and Robertson, H.D. (2002). Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA (New York, NY)* *8*, 1045-1055.
- Ma, H.C., Ke, C.H., Hsieh, T.Y., and Lo, S.Y. (2002). The first hydrophobic domain of the hepatitis C virus E1 protein is important for interaction with the capsid protein. *The Journal of general virology* *83*, 3085-3092.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S.M., and Yi, M. (2008). NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. *Journal of virology*.
- Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., and Harris, M. (2004). The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *The Journal of general virology* *85*, 721-729.

- Macdonald, A., and Harris, M. (2004). Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *The Journal of general virology* 85, 2485-2502.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, NY)* 240, 622-630.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C., Jr. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 507-537.
- Maillard, P., Huby, T., Andreo, U., Moreau, M., Chapman, J., and Budkowska, A. (2006). The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J* 20, 735-737.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *Journal of virology* 75, 8240-8250.
- Majeau, N., Gagne, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J.A., Ouellet, D., and Leclerc, D. (2004). The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *The Journal of general virology* 85, 971-981.
- Major, M.E., Mihalik, K., Puig, M., Rehmann, B., Nascimbeni, M., Rice, C.M., and Feinstone, S.M. (2002). Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *Journal of virology* 76, 6586-6595.
- Malcolm, B.A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., Chase, R., Gheyas, F., Hart, A., Hesk, D., *et al.* (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1013-1020.
- Mandl, C.W., Kroschewski, H., Allison, S.L., Kofler, R., Holzmann, H., Meixner, T., and Heinz, F.X. (2001). Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *Journal of virology* 75, 5627-5637.
- Mangia, A., Gentile, R., Cascavilla, I., Margaglione, M., Villani, M.R., Stella, F., Modola, G., Agostiano, V., Gaudiano, C., and Andriulli, A. (1999). HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *Journal of hepatology* 30, 984-989.
- Mangia, A., Santoro, R., Piattelli, M., Paziienza, V., Grifa, G., Iacobellis, A., and Andriulli, A. (2004). IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine* 25, 103-109.
- Manigold, T., Shin, E.C., Mizukoshi, E., Mihalik, K., Murthy, K.K., Rice, C.M., Piccirillo, C.A., and Rehmann, B. (2006). Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* 107, 4424-4432.
- Mankouri, J., Griffin, S., and Harris, M. (2008). The Hepatitis C Virus Non-Structural Protein NS5A Alters the Trafficking Profile of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*.
- Martell, M., Gomez, J., Esteban, J.I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R., and Guardia, J. (1999). High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 37, 327-332.
- Martin, C., Nielsen, S.U., Ibrahim, S., Bassendine, M.F., and Toms, G.L. (2008). Binding of liver derived, low density hepatitis C virus to human hepatoma cells. *Journal of medical virology* 80, 816-823.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., *et al.* (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of virology*.

- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T.S., Houghton, M., Pileri, P., and Abrignani, S. (2004). Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European journal of immunology* *34*, 2834-2842.
- Mason, A.L., Lau, J.Y., Hoang, N., Qian, K., Alexander, G.J., Xu, L., Guo, L., Jacob, S., Regenstein, F.G., Zimmerman, R., *et al.* (1999). Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md *29*, 328-333).
- Matsuo, E., Tani, H., Lim, C., Komoda, Y., Okamoto, T., Miyamoto, H., Moriishi, K., Yagi, S., Patel, A.H., Miyamura, T., *et al.* (2006). Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus. *Biochemical and biophysical research communications* *340*, 200-208.
- Maugeais, C., Tietge, U.J., Tsukamoto, K., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2000). Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice. *Journal of lipid research* *41*, 1673-1679.
- Mazzocca, A., Sciammetta, S.C., Carloni, V., Cosmi, L., Annunziato, F., Harada, T., Abrignani, S., and Pinzani, M. (2005). Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry* *280*, 11329-11339.
- McHutchison, J.G., Bacon, B.R., Gordon, S.C., Lawitz, E., Shiffman, M., Afdhal, N.H., Jacobson, I.M., Muir, A., Al-Adhami, M., Morris, M.L., *et al.* (2007). Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* (Baltimore, Md *46*, 1341-1349).
- McKiernan, S.M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G.S., Nolan, N., Crowley, J., Hegarty, J., Lawlor, E., and Kelleher, D. (2000). The MHC is a major determinant of viral status, but not fibrotic stage, in individuals infected with hepatitis C. *Gastroenterology* *118*, 1124-1130.
- McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of viral hepatitis* *7*, 2-14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* *21*, 3980-3988.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Dragic, T. (2008). The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of virology* *82*, 3555-3560.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of virology* *80*, 11571-11578.
- Mehta, S.H., Cox, A., Hoover, D.R., Wang, X.H., Mao, Q., Ray, S., Strathdee, S.A., Vlahov, D., and Thomas, D.L. (2002). Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* *359*, 1478-1483.
- Mele, A., Pulsoni, A., Bianco, E., Musto, P., Szklo, A., Sanpaolo, M.G., Iannitto, E., De Renzo, A., Martino, B., Liso, V., *et al.* (2003). Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas: an Italian multicenter case-control study. *Blood* *102*, 996-999.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T., and Leroux-Roels, G. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* (Baltimore, Md *41*, 847-856).
- Meunier, J.C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 4560-4565.
- Meyer-Olson, D., Shoukry, N.H., Brady, K.W., Kim, H., Olson, D.P., Hartman, K., Shintani, A.K., Walker, C.M., and Kalams, S.A. (2004). Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *The Journal of experimental medicine* *200*, 307-319.

- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.
- Michalak, J.P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.C., Ung, S., Rice, C.M., and Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *The Journal of general virology* 78 (Pt 9), 2299-2306.
- Minton, E.J., Smillie, D., Neal, K.R., Irving, W.L., Underwood, J.C., and James, V. (1998). Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *The Journal of infectious diseases* 178, 39-44.
- Minton, E.J., Smillie, D., Smith, P., Shipley, S., McKendrick, M.W., Gleeson, D.C., Underwood, J.C., Cannings, C., and Wilson, A.G. (2005). Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Human immunology* 66, 127-132.
- Misiani, R., Bellavita, P., Fenili, D., Borelli, G., Marchesi, D., Massazza, M., Vendramin, G., Comotti, B., Tanzi, E., Scudeller, G., *et al.* (1992). Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 117, 573-577.
- Miyazari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.
- Miyazari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H., and Shimotohno, K. (2003). Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *The Journal of biological chemistry* 278, 50301-50308.
- Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *Journal of virology* 68, 6215-6222.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghersa, P., *et al.* (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of hepatology* 46, 411-419.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of medical virology* 57, 223-229.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004a). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* 78, 13278-13284.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., and Wands, J.R. (1996). Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 222, 51-63.
- Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2004b). Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *Journal of virology* 78, 7400-7409.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H.E., and Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral research* 60, 103-109.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S., and Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *Journal of medical virology* 79, 714-723.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 511-516.

- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature medicine* 4, 1065-1067.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Koike, K. (1997). Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *The Journal of general virology* 78 (Pt 7), 1527-1531.
- Mottola, G., Cardinali, G., Ceccacci, A., Trozzi, C., Bartholomew, L., Torrisi, M.R., Pedrazzini, E., Bonatti, S., and Migliaccio, G. (2002). Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 293, 31-43.
- Mullbacher, A. (1994). The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *The Journal of experimental medicine* 179, 317-321.
- Munakata, T., Nakamura, M., Liang, Y., Li, K., and Lemon, S.M. (2005). Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18159-18164.
- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., and Nomoto, A. (2001). Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 146, 729-741.
- Murakami, K., Ishii, K., Ishihara, Y., Yoshizaki, S., Tanaka, K., Gotoh, Y., Aizaki, H., Kohara, M., Yoshioka, H., Mori, Y., *et al.* (2006). Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351, 381-392.
- Nagao, Y., Kameyama, T., and Sata, M. (1998). Hepatitis C virus RNA detection in oral lichen planus tissue. *Am J Gastroenterol* 93, 850.
- Nagao, Y., Tsubone, K., Kimura, R., Hanada, S., Kumashiro, R., Ueno, T., and Sata, M. (2002). High prevalence of anticardiolipin antibodies in patients with HCV-associated oral lichen planus. *Int J Mol Med* 9, 293-297.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42, 3858-3863.
- Nakai, K., Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Ishii, K., Lim, C.K., Tani, H., Matsuo, E., Abe, T., Mori, Y., Suzuki, T., *et al.* (2006). Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of virology* 80, 11265-11273.
- Napolitano, M., Giuliani, A., Alonzi, T., Mancone, C., D'Offizi, G., Tripodi, M., and Bravo, E. (2007). Very low density lipoprotein and low density lipoprotein isolated from patients with hepatitis C infection induce altered cellular lipid metabolism. *Journal of medical virology* 79, 254-258.
- Nascimbeni, M., Mizukoshi, E., Bosmann, M., Major, M.E., Mihalik, K., Rice, C.M., Feinstone, S.M., and Rehermann, B. (2003). Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *Journal of virology* 77, 4781-4793.
- Navas, M.C., Fuchs, A., Schvoerer, E., Bohbot, A., Aubertin, A.M., and Stoll-Keller, F. (2002). Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *Journal of medical virology* 67, 152-161.
- Neddermann, P., Clementi, A., and De Francesco, R. (1999). Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *Journal of virology* 73, 9984-9991.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., and De Francesco, R. (2004). Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *Journal of virology* 78, 13306-13314.

- Neumann-Haefelin, C., Blum, H.E., Chisari, F.V., and Thimme, R. (2005). T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 32, 75-85.
- Neumann-Haefelin, C., McKiernan, S., Ward, S., Viazov, S., Spangenberg, H.C., Killinger, T., Baumert, T.F., Nazarova, N., Sheridan, I., Pybus, O., *et al.* (2006). Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, 563-572.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W., and Toms, G.L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *Journal of virology* 80, 2418-2428.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Martin, C., Lowther, D., Purcell, P.J., King, B.J., Neely, D., and Toms, G.L. (2008). Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *The Journal of general virology* 89, 2507-2517.
- Niepmann, M. (1996). Porcine polypyrimidine tract-binding protein stimulates translation initiation at the internal ribosome entry site of foot-and-mouth-disease virus. *FEBS Lett* 388, 39-42.
- Nocente, R., Ceccanti, M., Bertazzoni, G., Cammarota, G., Silveri, N.G., and Gasbarrini, G. (2003). HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepato-gastroenterology* 50, 1149-1154.
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., and Hotta, H. (2006). Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *The Journal of general virology* 87, 1935-1945.
- O'Reilly, F.M., Darby, C., Fogarty, J., O'Moore, R., Courtney, M.G., O'Connor, J., Kay, E.W., Leader, M., Fielding, J.F., and Murphy, G.M. (1996). Porphyrin metabolism in hepatitis C infection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 12, 31-33.
- Oh, J.W., Ito, T., and Lai, M.M. (1999). A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *Journal of virology* 73, 7694-7702.
- Oh, J.W., Sheu, G.T., and Lai, M.M. (2000). Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *The Journal of biological chemistry* 275, 17710-17717.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *Embo J* 25, 5015-5025.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366-375.
- Oleksyk, T.K., Thio, C.L., Truelove, A.L., Goedert, J.J., Donfield, S.M., Kirk, G.D., Thomas, D.L., O'Brien, S.J., and Smith, M.W. (2005). Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance. *Genes and immunity* 6, 347-357.
- Olenina, L.V., Kuzmina, T.I., Sobolev, B.N., Kuraeva, T.E., Kolesanova, E.F., and Archakov, A.I. (2005). Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2*. *Journal of viral hepatitis* 12, 584-593.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, L., and Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The Journal of general virology* 82, 2589-2595.
- Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *The Journal of biological chemistry* 275, 31428-31437.
- Otto, G.A., Lukavsky, P.J., Lancaster, A.M., Sarnow, P., and Puglisi, J.D. (2002). Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA (New York, NY)* 8, 913-923.

- Owsianka, A., Clayton, R.F., Loomis-Price, L.D., McKeating, J.A., and Patel, A.H. (2001). Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *The Journal of general virology* 82, 1877-1883.
- Owsianka, A., Tarr, A.W., Juttla, V.S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F.L., Ball, J.K., and Patel, A.H. (2005). Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Journal of virology* 79, 11095-11104.
- Owsianka, A.M., Timms, J.M., Tarr, A.W., Brown, R.J., Hickling, T.P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B.J., Patel, A.H., and Ball, J.K. (2006). Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *Journal of virology* 80, 8695-8704.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orru, S., Narjes, F., and Steinkuhler, C. (2001). Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *Journal of virology* 75, 9939-9946.
- Pang, P.S., Jankowsky, E., Planet, P.J., and Pyle, A.M. (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *Embo J* 21, 1168-1176.
- Papatheodoridis, G.V., and Cholongitas, E. (2004). Chronic hepatitis C and no response to antiviral therapy: potential current and future therapeutic options. *Journal of viral hepatitis* 11, 287-296.
- Parfieniuk, A., Jaroszewicz, J., and Flisiak, R. (2007). Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 13, 5673-5681.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., and Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6104-6108.
- Pawlotsky, J.M. (2002a). Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 122, 1554-1568.
- Pawlotsky, J.M. (2002b). Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 36, S65-73).
- Pawlotsky, J.M., Lonjon, I., Hezode, C., Raynard, B., Darthuy, F., Remire, J., Soussy, C.J., and Dhumeaux, D. (1998). What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology (Baltimore, Md)* 27, 1700-1702).
- Pawlotsky, J.M., Prescott, L., Simmonds, P., Pellet, C., Laurent-Puig, P., Labonne, C., Darthuy, F., Remire, J., Duval, J., Buffet, C., *et al.* (1997). Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 35, 1734-1739.
- Pawlotsky, J.M., Roudot-Thoraval, F., Simmonds, P., Mellor, J., Ben Yahia, M.B., Andre, C., Voisin, M.C., Intrator, L., Zafrani, E.S., Duval, J., *et al.* (1995). Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med* 122, 169-173.
- Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell* 15, 384-396.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004a). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of biological chemistry* 279, 40835-40843.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deleage, G., and Pawlotsky, J.M. (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. *Journal of virology* 75, 5703-5710.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.M. (2004b). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* 39, 5-19).

- Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chretien, Y., Koike, K., Pessayre, D., Chapman, J., Barba, G., *et al.* (2002). Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *Faseb J* 16, 185-194.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., *et al.* (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6025-6030.
- Peterson, J., Green, G., Iida, K., Caldwell, B., Kerrison, P., Bernich, S., Aoyagi, K., and Lee, S.R. (2000). Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. *Vox sanguinis* 78, 80-85.
- Pfeifer, U., Thomssen, R., Legler, K., Bottcher, U., Gerlich, W., Weinmann, E., and Klinge, O. (1980). Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 33, 233-243.
- Pham, T.N., MacParland, S.A., Mulrooney, P.M., Cooksley, H., Naoumov, N.V., and Michalak, T.I. (2004). Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *Journal of virology* 78, 5867-5874.
- Piccininni, S., Varaklioti, A., Nardelli, M., Dave, B., Raney, K.D., and McCarthy, J.E. (2002). Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *The Journal of biological chemistry* 277, 45670-45679.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., *et al.* (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of virology* 76, 4008-4021.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., and Bartenschlager, R. (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *Journal of virology* 75, 1252-1264.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., *et al.* (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science (New York, NY)* 282, 938-941.
- Pockros, P.J. (2002). Developments in the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 11, 515-528.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology* 77, 4070-4080.
- Prabhu, R., Garry, R.F., and Dash, S. (2006). Small interfering RNA targeted to stem-loop II of the 5' untranslated region effectively inhibits expression of six HCV genotypes. *Virol J* 3, 100.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D., and Gage, P.W. (2004). Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett* 557, 99-103.
- Price, D.A., Bassendine, M.F., Norris, S.M., Golding, C., Toms, G.L., Schmid, M.L., Morris, C.M., Burt, A.D., and Donaldson, P.T. (2006). Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut* 55, 715-718.
- Prieto, J., Yuste, J.R., Beloqui, O., Civeira, M.P., Riezu, J.I., Aguirre, B., and Sangro, B. (1996). Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md)* 23, 199-204.

- Prummel, M.F., and Laurberg, P. (2003). Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 13, 547-551.
- Pudi, R., Abhiman, S., Srinivasan, N., and Das, S. (2003). Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *The Journal of biological chemistry* 278, 12231-12240.
- Pudi, R., Srinivasan, P., and Das, S. (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. *The Journal of biological chemistry* 279, 29879-29888.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Qiao, M., Murata, K., Davis, A.R., Jeong, S.H., and Liang, T.J. (2003). Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. *Hepatology (Baltimore, Md)* 37, 52-59.
- Quiroga, J.A., Llorente, S., Castillo, I., Rodriguez-Inigo, E., Lopez-Alcorocho, J.M., Pardo, M., and Carreno, V. (2006). Virus-specific T-cell responses associated with hepatitis C virus (HCV) persistence in the liver after apparent recovery from HCV infection. *Journal of medical virology* 78, 1190-1197.
- Radkowski, M., Gallegos-Orozco, J.F., Jablonska, J., Colby, T.V., Walewska-Zielecka, B., Kubicka, J., Wilkinson, J., Adair, D., Rakela, J., and Laskus, T. (2005). Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 41, 106-114.
- Radkowski, M., Wilkinson, J., Nowicki, M., Adair, D., Vargas, H., Ingui, C., Rakela, J., and Laskus, T. (2002). Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *Journal of virology* 76, 600-608.
- Randall, G., and Rice, C.M. (2004). Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 102, 19-25.
- Ray, R.B., Lagging, L.M., Meyer, K., and Ray, R. (1996). Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *Journal of virology* 70, 4438-4443.
- Razvi, S., Schneider, L., Jonas, M.M., and Cunningham-Rundles, C. (2001). Outcome of intravenous immunoglobulin-transmitted hepatitis C virus infection in primary immunodeficiency. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 101, 284-288.
- Reaven, E., Zhan, L., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., and Azhar, S. (2000). Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *Journal of lipid research* 41, 343-356.
- Reed, K.E., and Rice, C.M. (2000). Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 55-84.
- Reynolds, J.E., Kaminski, A., Kettinen, H.J., Grace, K., Clarke, B.E., Carroll, A.R., Rowlands, D.J., and Jackson, R.J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 14, 6010-6020.
- Rhinds, D., and Brissette, L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 39-77.
- Richmond, A. (2002). Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nature reviews* 2, 664-674.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.

- Rijnbrand, R., Abell, G., and Lemon, S.M. (2000). Mutational analysis of the GB virus B internal ribosome entry site. *Journal of virology* 74, 773-783.
- Rivera, J., de Diego, A., Trinchet, M., and Garcia Monforte, A. (1997). Fibromyalgia-associated hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol* 36, 981-985.
- Roberts, S.K., Cooksley, G., Dore, G.J., Robson, R., Shaw, D., Berns, H., Hill, G., Klumpp, K., Najera, I., and Washington, C. (2008). Robust antiviral activity of R1626, a novel nucleoside analog: A randomized, placebo-controlled study in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md).
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., *et al.* (1998). Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy*. In *Arch Virol*, pp. 2493-2503.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., *et al.* (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. *Journal of virology* 77, 1856-1867.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., *et al.* (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 3, e1866.
- Rodger, A.J., Roberts, S., Lanigan, A., Bowden, S., Brown, T., and Crofts, N. (2000). Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology* (Baltimore, Md) 32, 582-587).
- Roingard, P., and Hourieux, C. (2008). Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of viral hepatitis* 15, 157-164.
- Roingard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D., and Ait-Goughoulte, M. (2004). Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96, 103-108.
- Roque Afonso, A.M., Jiang, J., Penin, F., Tareau, C., Samuel, D., Petit, M.A., Bismuth, H., Dussaix, E., and Feray, C. (1999). Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *Journal of virology* 73, 9213-9221.
- Rosa, D., Saletti, G., De Gregorio, E., Zorat, F., Comar, C., D'Oro, U., Nuti, S., Houghton, M., Barnaba, V., Pozzato, G., *et al.* (2005). Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18544-18549.
- Rosen, H.R., Miner, C., Sasaki, A.W., Lewinsohn, D.M., Conrad, A.J., Bakke, A., Bouwer, H.G., and Hinrichs, D.J. (2002). Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* (Baltimore, Md) 35, 190-198).
- Roudot-Thoraval, F., Bastie, A., Pawlotsky, J.M., and Dhumeaux, D. (1997). Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. *The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus*. *Hepatology* (Baltimore, Md) 26, 485-490).
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., *et al.* (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of virology* 80, 2832-2841.
- Sabile, A., Perlemuter, G., Bono, F., Kohara, K., Demaugre, F., Kohara, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Brechot, C., and Barba, G. (1999). Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* (Baltimore, Md) 30, 1064-1076).

- Saito, T., Ji, G., Shinzawa, H., Okumoto, K., Hattori, E., Adachi, T., Takeda, T., Sugahara, K., Ito, J.I., Watanabe, H., *et al.* (2004). Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochemical and biophysical research communications* 317, 335-341.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11646-11651.
- Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., *et al.* (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 1, 333-337.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F.L., and Bartosch, B. (2005). Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *The Journal of general virology* 86, 3189-3199.
- Sansonno, D., Lotesoriere, C., Cornacchiulo, V., Fanelli, M., Gatti, P., Iodice, G., Racanelli, V., and Dammacco, F. (1998). Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood* 92, 3328-3337.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., and Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *Journal of virology* 69, 7461-7471.
- Sato, K., Okamoto, H., Aihara, S., Hoshi, Y., Tanaka, T., and Mishiro, S. (1993). Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 196, 354-357.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., and Kohn, L.D. (2003). Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of virology* 77, 546-559.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal* 21, 5017-5025.
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001). Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 276, 44052-44063.
- Schofield, D.J., Bartosch, B., Shimizu, Y.K., Allander, T., Alter, H.J., Emerson, S.U., Cosset, F.L., and Purcell, R.H. (2005). Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42, 1055-1062.
- Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G.M., Day, C.L., Kim, A.Y., Ouchi, K., Duncan, J.E., Wurcel, A.G., Timm, J., Jones, A.M., Mothe, B., *et al.* (2005). Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175, 3603-3613.
- Schuster, C., Isel, C., Imbert, I., Ehresmann, C., Marquet, R., and Kieny, M.P. (2002). Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *Journal of virology* 76, 8058-8068.
- Seeff, L.B., Hollinger, F.B., Alter, H.J., Wright, E.C., Cain, C.M., Buskell, Z.J., Ishak, K.G., Iber, F.L., Toro, D., Samanta, A., *et al.* (2001). Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: A National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33, 455-463.
- Seeger, C. (2005). Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiol* 13, 528-534.
- 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, 212-227.

- Semmo, N., Day, C.L., Ward, S.M., Lucas, M., Harcourt, G., Loughry, A., and Klenerman, P. (2005). Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* (Baltimore, Md 41, 1019-1028).
- Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annual review of microbiology* 55, 255-281.
- Sen, G.C., and Sarkar, S.N. (2005). Hitching RIG to action. *Nature immunology* 6, 1074-1076.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8496-8501.
- Serafino, A., Valli, M.B., Andreola, F., Crema, A., Ravagnan, G., Bertolini, L., and Carloni, G. (2003). Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *Journal of medical virology* 70, 31-41.
- Serebrov, V., and Pyle, A.M. (2004). Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430, 476-480.
- Shelness, G.S., and Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Current opinion in lipidology* 12, 151-157.
- Shi, S.T., Lee, K.J., Aizaki, H., Hwang, S.B., and Lai, M.M. (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of virology* 77, 4160-4168.
- Shi, S.T., Polyak, S.J., Tu, H., Taylor, D.R., Gretch, D.R., and Lai, M.M. (2002). Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 292, 198-210.
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y.Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., and Murakami, S. (2004). Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *Journal of virology* 78, 2738-2748.
- Shimakami, T., Honda, M., Kusakawa, T., Murata, T., Shimotohno, K., Kaneko, S., and Murakami, S. (2006). Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *Journal of virology* 80, 3332-3340.
- Shimizu, Y.K., Feinstone, S.M., Kohara, M., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1996). Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* (Baltimore, Md 23, 205-209).
- Shimizu, Y.K., Hijikata, M., Iwamoto, A., Alter, H.J., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1994). Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *Journal of virology* 68, 1494-1500.
- Shimizu, Y.K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1992). Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5477-5481.
- Shimizu, Y.K., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1993). Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6037-6041.
- Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. (2006). Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345, 434-445.
- Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of virology* 73, 9718-9725.

- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *The Journal of biological chemistry* 277, 11149-11155.
- Shoukry, N.H., Cawthon, A.G., and Walker, C.M. (2004). Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annual review of microbiology* 58, 391-424.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* 197, 1645-1655.
- Simmonds, P. (1999). Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology* 31 Suppl 1, 54-60.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., *et al.* (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42, 962-973.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science (New York, NY)* 290, 1721-1726.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., and Hellen, C.U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *Journal of virology* 72, 4775-4782.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of virology* 80, 11579-11588.
- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science (New York, NY)* 291, 1959-1962.
- Spangberg, K., Goobar-Larsson, L., Wahren-Herlenius, M., and Schwartz, S. (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, 296-307.
- Spangberg, K., Wiklund, L., and Schwartz, S. (2001). Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *The Journal of general virology* 82, 113-120.
- Spangenberg, H.C., Viazov, S., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., McKinney, D., Roggendorf, M., von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Thimme, R. (2005). Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42, 828-837.
- Steinmann, D., Barth, H., Gissler, B., Schurmann, P., Adah, M.I., Gerlach, J.T., Pape, G.R., Depla, E., Jacobs, D., Maertens, G., *et al.* (2004). Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *Journal of virology* 78, 9030-9040.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS pathogens* 3, e103.
- Stuyver, L., Wyseur, A., van Arnhem, W., Hernandez, F., and Maertens, G. (1996). Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 34, 2259-2266.
- Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F.A., Alter, H.J., and Chang, K.M. (2003a). Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 38, 1437-1448.

- Sugimoto, K., Stadanlick, J., Ikeda, F., Brensinger, C., Furth, E.E., Alter, H.J., and Chang, K.M. (2003b). Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. *Hepatology* (Baltimore, Md 37, 590-599).
- Sulkowski, M.S. (2007). Specific targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Current gastroenterology reports* 9, 5-13.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of virology* 79, 2689-2699.
- Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., Ando, A., Chiba, J., Harada, S., Saito, I., and Miyamura, T. (1995). Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *The Journal of general virology* 76 (Pt 1), 53-61.
- Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., and Wakita, T. (2007). Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 1200-1212.
- Svoboda, P., and Di Cara, A. (2006). Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol Life Sci* 63, 901-908.
- Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S., and Hwang, L.H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *Journal of virology* 70, 8477-8484.
- Tai, D.I., Tsai, S.L., Chen, Y.M., Chuang, Y.L., Peng, C.Y., Sheen, I.S., Yeh, C.T., Chang, K.S., Huang, S.N., Kuo, G.C., *et al.* (2000). Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* (Baltimore, Md 31, 656-664).
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J.L., Manns, M.P., and Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature medicine* 6, 578-582.
- Tan, S.L., and Katze, M.G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284, 1-12.
- Tan, S.L., Pause, A., Shi, Y., and Sonenberg, N. (2002). Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov* 1, 867-881.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology* 70, 3307-3312.
- Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000). Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* 270, 229-236.
- Tanji, Y., Hijikata, M., Hirowatari, Y., and Shimotohno, K. (1994). Hepatitis C virus polyprotein processing: kinetics and mutagenic analysis of serine proteinase-dependent cleavage. *Journal of virology* 68, 8418-8422.
- Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T., and Shimotohno, K. (1995). Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *Journal of virology* 69, 1575-1581.
- Taura, Y., Fujiyama, S., Kawano, S., Sato, S., Tanaka, M., Goto, M., Chikazawa, H., Shibata, J., Mizuno, K., and Sato, T. (1995). Clinical evaluation of titration of hepatitis C virus core antibody and its subclasses. *Journal of gastroenterology and hepatology* 10, 270-276.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS pathogens* 4, e1000032.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *The Journal of biological chemistry* 279, 48576-48587.

- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* *435*, 374-379.
- Tellinghuisen, T.L., and Rice, C.M. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* *5*, 419-427.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 15661-15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* *194*, 1395-1406.
- Thio, C.L., Gao, X., Goedert, J.J., Vlahov, D., Nelson, K.E., Hilgartner, M.W., O'Brien, S.J., Karacki, P., Astemborski, J., Carrington, M., *et al.* (2002). HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *Journal of virology* *76*, 4792-4797.
- Thio, C.L., Nolt, K.R., Astemborski, J., Vlahov, D., Nelson, K.E., and Thomas, D.L. (2000). Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* *38*, 575-577.
- Thio, C.L., Thomas, D.L., Goedert, J.J., Vlahov, D., Nelson, K.E., Hilgartner, M.W., O'Brien, S.J., Karacki, P., Marti, D., Astemborski, J., *et al.* (2001). Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *The Journal of infectious diseases* *184*, 16-21.
- Thomson, B.J., and Finch, R.G. (2005). Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* *11*, 86-94.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Kochel, H.G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* *181*, 293-300.
- Thornhill, M.H. (2001). Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand* *59*, 174-177.
- Thursz, M., Yallop, R., Goldin, R., Trepo, C., and Thomas, H.C. (1999). Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* *354*, 2119-2124.
- Tibbs, C., Donaldson, P., Underhill, J., Thomson, L., Manabe, K., and Williams, R. (1996). Evidence that the HLA DQA1*03 allele confers protection from chronic HCV-infection in Northern European Caucasoids. *Hepatology (Baltimore, Md)* *24*, 1342-1345.
- Toniutto, P., Fabris, C., Bitetto, D., Fornasiere, E., Rapetti, R., and Pirisi, M. (2007). Valopicitabine dihydrochloride: a specific polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *Curr Opin Investig Drugs* *8*, 150-158.
- Toniutto, P., Fabris, C., Fumo, E., Apollonio, L., Caldato, M., Mariuzzi, L., Avellini, C., Minisini, R., and Pirisi, M. (2004). Carriage of the apolipoprotein E-epsilon4 allele and histologic outcome of recurrent hepatitis C after antiviral treatment. *Am J Clin Pathol* *122*, 428-433.
- Torres, D.M., and Harrison, S.A. (2008). HCV replication and statin pleiotropism: an adjuvant treatment panacea? *Am J Gastroenterol* *103*, 1390-1392.
- Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology* *80*, 1734-1741.
- Tseng, C.T., and Klimpel, G.R. (2002). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *The Journal of experimental medicine* *195*, 43-49.

- Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., and Shimotohno, K. (1997). Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *Journal of virology* *71*, 6720-6726.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* *66*, 1476-1483.
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. (2002). Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology (Baltimore, Md)* *35*, 937-946.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S.T., Taylor, D.R., Yang, T., Mircheff, A.K., Wen, Y., Gorbalenya, A.E., Hwang, S.B., and Lai, M.M. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* *263*, 30-41.
- Uchida, M., Hino, N., Yamanaka, T., Fukushima, H., Imanishi, T., Uchiyama, Y., Kodama, T., and Doi, T. (2002). Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatology Res* *22*, 297-306.
- Ulsenheimer, A., Gerlach, J.T., Gruener, N.H., Jung, M.C., Schirren, C.A., Schraut, W., Zachoval, R., Pape, G.R., and Diepolder, H.M. (2003). Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* *37*, 1189-1198.
- Umehara, T., Sudoh, M., Yasui, F., Matsuda, C., Hayashi, Y., Chayama, K., and Kohara, M. (2006). Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochemical and biophysical research communications* *346*, 67-73.
- Urbani, S., Amadei, B., Fisticaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., and Ferrari, C. (2006a). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology (Baltimore, Md)* *44*, 126-139.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., and Ferrari, C. (2006b). PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of virology* *80*, 11398-11403.
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., and Mavromara, P. (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *The Journal of biological chemistry* *277*, 17713-17721.
- Vassilaki, N., and Mavromara, P. (2003). Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/core+1 coding open reading frame. *The Journal of biological chemistry* *278*, 40503-40513.
- Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature immunology* *1*, 47-53.
- Vejbaesya, S., Songsivilai, S., Tanwandee, T., Rachaibun, S., Chantangpol, R., and Dharakul, T. (2000). HLA association with hepatitis C virus infection. *Human immunology* *61*, 348-353.
- Vicari, A.P., Schmalbach, T., Lekstrom-Himes, J., Morris, M.L., Al-Adhami, M.J., Laframboise, C., Leese, P., Krieg, A.M., Efler, S.M., and Davis, H.L. (2007). Safety, pharmacokinetics and immune effects in normal volunteers of CPG 10101 (ACTILON), an investigational synthetic toll-like receptor 9 agonist. *Antiviral therapy* *12*, 741-751.
- Villano, S.A., Vlahov, D., Nelson, K.E., Cohn, S., and Thomas, D.L. (1999). Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* *29*, 908-914.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *The Journal of biological chemistry* *280*, 7793-7799.

- Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96, 413-420.
- von Hahn, T., Lindenbach, B.D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2006). Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, 932-942.
- Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C., Nuti, S., Klimpel, G., and Abrignani, S. (2001). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *European journal of immunology* 31, 166-175.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., *et al.* (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11, 791-796.
- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., and Branch, A.D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA (New York, NY)* 7, 710-721.
- Wang, C., Gale, M., Jr., Keller, B.C., Huang, H., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Ye, J. (2005). Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Molecular cell* 18, 425-434.
- Wang, C., Le, S.Y., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA (New York, NY)* 1, 526-537.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of virology* 67, 3338-3344.
- Wang, J.T., Sheu, J.C., Lin, J.T., Wang, T.H., and Chen, D.S. (1992). Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of infectious diseases* 166, 1167-1169.
- Wang, T.H., Rijnbrand, R.C., and Lemon, S.M. (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. *Journal of virology* 74, 11347-11358.
- Waris, G., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2004). Two-step affinity purification of the hepatitis C virus ribonucleoprotein complex. *RNA (New York, NY)* 10, 321-329.
- Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M., and Shimotohno, K. (2003). Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 38, 1282-1288.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Molecular cell* 19, 111-122.
- Wawrzynowicz-Syczewska, M., Underhill, J.A., Clare, M.A., Boron-Kaczmarek, A., McFarlane, I.G., and Donaldson, P.T. (2000). HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver* 20, 234-239.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B.A., Kuo, L.C., and Darke, P.L. (2001). Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13931-13935.
- Wedemeyer, H., He, X.S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H., and Rehermann, B. (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169, 3447-3458.

- Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q.L., Houghton, M., *et al.* (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848.
- Wertheimer, A.M., Miner, C., Lewinsohn, D.M., Sasaki, A.W., Kaufman, E., and Rosen, H.R. (2003). Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* (Baltimore, Md 37, 577-589).
- Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic acids research* 36, 3054-3064.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of virology* 74, 2293-2304.
- Wong, V.S., Egner, W., Elsey, T., Brown, D., and Alexander, G.J. (1996). Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 104, 25-31.
- Wood, J., Frederickson, R.M., Fields, S., and Patel, A.H. (2001). Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. *Journal of virology* 75, 1348-1358.
- Wozniak, M.A., Itzhaki, R.F., Faragher, E.B., James, M.W., Ryder, S.D., and Irving, W.L. (2002). Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* (Baltimore, Md 36, 456-463).
- Wu, G.Y., Konishi, M., Walton, C.M., Olive, D., Hayashi, K., and Wu, C.H. (2005). A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 128, 1416-1423.
- Wunschmann, S., Medh, J.D., Klinzmann, D., Schmidt, W.N., and Stapleton, J.T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of virology* 74, 10055-10062.
- Xiang, A.X., Webber, S.E., Kerr, B.M., Rueden, E.J., Lennox, J.R., Haley, G.J., Wang, T., Ng, J.S., Herbert, M.R., Clark, D.L., *et al.* (2007). Discovery of ANA975: an oral prodrug of the TLR-7 agonist isatoribine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26, 635-640.
- Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P., and Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244, 513-520.
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W., and Ou, J.H. (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 77, 1578-1583.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J., and Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* 20, 3840-3848.
- Yamada, E., Montoya, M., Schuettler, C.G., Hickling, T.P., Tarr, A.W., Vitelli, A., Dubuisson, J., Patel, A.H., Ball, J.K., and Borrow, P. (2005). Analysis of the binding of hepatitis C virus genotype 1a and 1b E2 glycoproteins to peripheral blood mononuclear cell subsets. *The Journal of general virology* 86, 2507-2512.
- Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yorihuzi, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T., and Date, T. (1996). Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223, 255-261.
- Yamaga, A.K., and Ou, J.H. (2002). Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *The Journal of biological chemistry* 277, 33228-33234.

- Yamaguchi, A., Tazuma, S., Nishioka, T., Ohishi, W., Hyogo, H., Nomura, S., and Chayama, K. (2005). Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci* 50, 1361-1371.
- Yamaguchi, K., Tanaka, E., Higashi, K., Kiyosawa, K., Matsumoto, A., Furuta, S., Hasegawa, A., Tanaka, S., and Kohara, M. (1994). Adaptation of hepatitis C virus for persistent infection in patients with acute hepatitis. *Gastroenterology* 106, 1344-1348.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2291-2295.
- Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A.D., Le, H.V., and Weber, P.C. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* 4, 463-467.
- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R., and Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* 72, 6048-6055.
- Ye, J. (2007). Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS pathogens* 3, e108.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gale, M., Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15865-15870.
- Yee, L.J. (2004). Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes and immunity* 5, 237-245.
- Yee, L.J., Knapp, S., Burgner, D., Hennig, B.J., Frodsham, A.J., Wright, M., Thomas, H.C., Hill, A.V., and Thursz, M.R. (2004). Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection. *Genes and immunity* 5, 183-187.
- Yi, M., and Lemon, S.M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 77, 3557-3568.
- Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T., and Lemon, S.M. (2006). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2310-2315.
- Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M., *et al.* (2003). Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO reports* 4, 602-608.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5, 730-737.
- You, S., and Rice, C.M. (2008). 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *Journal of virology* 82, 184-195.
- You, S., Stump, D.D., Branch, A.D., and Rice, C.M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* 78, 1352-1366.
- Yu, G.Y., Lee, K.J., Gao, L., and Lai, M.M. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *Journal of virology* 80, 6013-6023.
- Zavaglia, C., Martinetti, M., Silini, E., Bottelli, R., Daielli, C., Asti, M., Airoldi, A., Salvaneschi, L., Mondelli, M.U., and Ideo, G. (1998). Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 28, 1-7.

- Zein, N.N., Li, H., and Persing, D.H. (1999). Humoral immunity in acute and chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* *117*, 510.
- Zeisel, M.B., Cosset, F.L., and Baumert, T.F. (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md *48*, 299-307).
- Zeisel, M.B., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffoel, M., and Baumert, T.F. (2007a). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* *13*, 4824-4830.
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., *et al.* (2007b). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* (Baltimore, Md *46*, 1722-1731).
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004a). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of virology* *78*, 1448-1455.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., and Korber, B. (2004b). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* *14*, 1229-1246.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., and Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of virology* *81*, 12465-12471.
- Zheng, X., Pang, M., Chan, A., Roberto, A., Warner, D., and Yen-Lieberman, B. (2003). Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods. *J Clin Virol* *28*, 214-216.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 9294-9299.
- Zignego, A.L., Ferri, C., Pileri, S.A., Caini, P., and Bianchi, F.B. (2007). Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* *39*, 2-17.
- Zignego, A.L., Giannelli, F., Marrocchi, M.E., Mazzocca, A., Ferri, C., Giannini, C., Monti, M., Caini, P., Villa, G.L., Laffi, G., *et al.* (2000). T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md *31*, 474-479).
- Zinkernagel, R.M. (2002). On differences between immunity and immunological memory. *Current opinion in immunology* *14*, 523-536.
- Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annual review of immunology* *14*, 333-367.
- Zoulim, F., Chevallier, M., Maynard, M., and Trepo, C. (2003). Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* *13*, 57-68.

VIII ANNEXE: Résultats soumis à publication

Apolipoprotein E is host factor required for release of infectious hepatitis C virus particles

Wagane J.A. Benga^{1,2}, Maria Dimitrova^{1,2}, Sophie Krieger^{1,2}, Christine Thumann^{1,2}, Ralf Bartenschlager³, Guangxiang Luo⁴, Thomas F. Baumert^{1,2,5} and Catherine Schuster^{1,2*}

¹Inserm U748, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; ²Institut de Virologie, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; ³Department of Molecular Virology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 345, D-69120 Heidelberg, Germany, ⁴Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, USA, ⁵Service d'Hépatogastroentérologie, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg, France,

Running title: ApoE-NS5A interaction and virion release

Keywords: infection, liver, lipid metabolism, virus-host interactions, treatment

Footnotes

Corresponding author: Dr. Catherine Schuster, PhD, Inserm U748, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg France, phone: (++33) 3 90 24 37 41, fax: (++33) 3 90 24 37 24, e-mail: catherine.schuster@viro-ulp.u-strasbg.fr

Abbreviations: CLDN1: claudin-1; HCV: hepatitis C virus; HCVcc: cell culture-derived HCV; HCVpp: HCV pseudotype particles; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; siRNA: small interfering RNA; SR-BI: scavenger receptor class B type I

Financial support: This work was supported by Inserm, France, the European Union (LSHM-CT-2004-503359), the chair of excellence program of the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-CEXC-008), France, the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS-06221), France, the FRM-BNP Paribas Foundation, Paris, France, the CONECTUS program of Louis Pasteur University, Strasbourg, France and the Else-Kröner-Fresenius Foundation (P17/07//A83/06), Bad Homburg, Germany.

ABSTRACT

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of liver disease world-wide. Restriction of HCV infection to human hepatocytes suggests that liver-specific host factors play a role for the viral life cycle. Using a yeast-two-hybrid system, we identified apolipoprotein E (apoE) as a liver-derived host factor specifically interacting with HCV nonstructural protein 5A (NS5A) but not with other viral proteins. The relevance of apoE-NS5A interaction for viral infection was confirmed by co-immunoprecipitation and co-localization studies of apoE and NS5A in an infectious HCV cell culture model system. Silencing of apoE expression resulted in a marked inhibition of infectious particle production without affecting viral replication. Analysis of particle production in liver-derived cells with silenced apoE expression showed an impairment of infectious particle release. In conclusion, these results suggest that NS5A may recruit apoE to the viral assembly complex and particle-associated apoE triggers release of infectious viral particles. These findings may have not only important implications for the understanding of the HCV life cycle but also for the development of novel antiviral strategies targeting HCV-lipoprotein interaction.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver disease including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). Thus, with an estimated 170 million infected individuals, HCV has a strong impact on public health. HCV is an RNA enveloped single stranded virus of positive polarity which is the sole member of the genus *Hepacivirus* within the family *Flaviviridae* (2). The HCV RNA genome encodes a unique polyprotein of about 3000 amino acids, and is flanked at its 5' and 3' ends by two highly conserved untranslated regions (UTR) involved in the translation and replication processes of the virus, respectively. The polyprotein encodes at least 10 proteins. The structural proteins comprise the capsid protein core, the glycoproteins E1 and E2. The non-structural proteins include the NS2-3 protease, the NS3 serine protease and RNA helicase, the NS4A polypeptide, the NS4B and NS5A proteins and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The liver is the primary target organ of HCV and robust replication of HCV takes place only in the hepatocyte. The virus enters the cell by interaction of the viral glycoproteins with cellular co-factors (3, 4). Following viral entry by clathrin-mediated endocytosis, viral translation and replication occurs in a cellular compartment termed the membranous web which is followed by viral assembly and particle egress (3, 4).

A unique feature of the hepatocyte is its key role in lipid metabolism. Increasing evidence suggests that the HCV life cycle and hepatocyte lipid metabolism pathways are closely linked. Indeed, HCV replication takes place at specialized rearranged intracellular membranes termed "membranous web" (5). Membrane vesicles containing the HCV replication complex have been shown to be highly enriched in proteins required for very low density lipoprotein (VLDL) assembly, including apolipoprotein B (apoB), apolipoprotein E (apoE), and microsomal triglyceride transfer protein (6). Furthermore, the VLDL pathway has been shown to play a role for assembly and maturation of infectious viral particles (6, 7). Moreover, a hepatocyte organelle storing lipids - the lipid droplet - has been shown to be

important for the production of infectious virus particles (8, 10). Miyamura and colleagues elegantly demonstrated that the viral capsid protein core recruits viral non-structural proteins and replication complexes to lipid droplet associated membranes, and that this recruitment is critical for producing infectious viruses (10). Finally, Luo et al. (19) have shown that HCV infectious virions purified from low density fractions from cell culture supernatants are assembled as ApoE-enriched lipoprotein particles and can be specifically precipitated by anti-apoE and anti-E2 monoclonal antibodies (19). These findings indicate that apoE is required for HCV virion infectivity and production. However, the mechanism of apoE-HCV interaction and its function in production of infectious particles remains unclear.

Recent evidence suggests that the viral nonstructural protein NS5A plays an important role in HCV virion production. NS5A was found to be recruited by core-associated lipid droplets in replicating Huh7.5 cells for production of infectious particles (9, 10). Introduction of specific mutations into the NS5A showed that mutations in NS5A C-terminal domain III abolished core-NS5A co-localization in the HCV replicating cells and hampered virion production (10, 11). These data identify NS5A as a viral key factor for assembly of infectious viral particles (10, 11).

In this study, we demonstrate that apoE interacts specifically with HCV NS5A in an infectious cell culture system and that apoE is required for release of infectious particles. These results identify a novel host factor interacting with NS5A protein and elucidate the impact of lipid proteins for viral release.

Materials and methods

Plasmids. Yeast two-hybrid system expression plasmids have been described in Dimitrova et al., (20). The full-length apoE cDNA cloned in pOTB7 vector was purchased from Open Biosystems (Huntsville Alabama). Following digestion of the plasmid by EcoRI-XhoI ApoE1 cDNA was inserted in the pGADT7 EcoRI-XhoI sites. Plasmids pFK-Jc1 (Jc1) and pFK-Luc-Jc1 (Luc-Jc1) have been described (21-24) and encode chimeric HCV genome designated Jc1 which consists of J6CF/JFH1 segments. The latter construct (Luc-Jc1) represents a bicistronic reporter virus carrying a firefly-luciferase reporter gene (21).

Yeast and bacteria strains. The apoE clone (Clontech, Cat #638802) was transformed in *S. cerevisiae* strain Y187 [MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , MEL1, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ]. The pGBKT7 plasmids expressing the HCV NS proteins were transformed in the *S. cerevisiae* strain AH109 (MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 \square , gal80 \square , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ). The library vectors were amplified in *E. Coli* KC8 cells (CLONTECH Laboratories, Inc.), and those carrying the hybrid construct in *E. coli* XL1 blue cells (Stratagene).

Antibodies. Monoclonal mouse anti-NS5A was obtained from Virostat, monoclonal anti-apoE (Ab23, Ab33) have been described (19).

Yeast two-hybrid assays. Yeast two-hybrid assays were performed as described in Dimitrova et al., (20). In this system, interaction between two proteins is indicated by the activation of the reporter genes HIS3 and ADE2, which allow grow on *HIS3*-*ADE*- plates. The pGBKT7- and pGADT7-derived constructs encoding HCV NS proteins were cotransformed into AH109 (MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ) cells. Co-transformants were grown for about 24 h in –LEU –TRP medium and then spotted

onto –TRP –LEU culture plates to select for co-transformants and onto –TRP –LEU –HIS - ADE culture plates to allow for selection of interactants.

Co-immunoprecipitation of NS5A and apoE in HCV replicating cells. Co-immunoprecipitation experiments were performed as described previously (20). Briefly, subconfluent Jc1 replicating Huh-7.5.1 cells (grown in 6-well-plates) (29) were washed in PBS, lysed in 300 µl of lysis buffer (Promega). Following lysis cellular debris and nuclei were removed by low-speed centrifugation. Lysates from 5×10^5 cells were then precleared by the addition of 30 µl of protein A/G-agarose for 1 h at room temperature. Protein A/G-agarose-preabsorbed anti-NS5A monoclonal antibodies (7.5 or 15 µg/ml; Virostat) or an unrelated c-myc-tag isotype control antibody (7.5 or 15 µg/ml; Sigma) were then incubated with the precleared cell lysates, and immunoprecipitations were performed as described in (20). Immunoprecipitated proteins were then analyzed by SDS-PAGE and were subjected to western blot analysis. ApoE protein was detected using monoclonal anti-apoE antibody 33 (dilution 1/500)(19) and an horseradish-peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibody (dilution 1/5000, Amersham).

RNA interference assay. Commercially available siRNAs pools targeting apoE as well as two control non-targeting siRNAs were purchased from Dharmacon (Pierce) and transfected into Huh7.5 cells using DharmaFect™ solution (Pierce) following the manufacturer's protocol. Silencing of ApoE protein expression was assessed by Western blot 72 h after transfection of siRNA as described previously (22). 72 h after transfection of siRNAs, cells were subjected to HCV infection with recombinant HCVcc or HCVpp or electroporated with Luc-Jc1 RNA.

Production of HCV pseudotypes and infection of Huh7.5 cells.

MLV-based HCVpp (genotype 1a strain H77) were generated as previously described (22, 25, 26). Briefly, 293T cells were transfected with expression vectors encoding the viral components, E1E2 glycoproteins, retroviral core proteins, and packaging-competent

luciferase reporter gene-containing retroviral transfer vectors using a calcium phosphate transfection protocol (CLONTECH Laboratories, Inc.). The medium was replaced 16 h after transfection. Supernatants containing HCVpp were harvested 24 h later, filtered through 0.45- μ m pore-sized membranes and stored at 4°C or -80°C. For infection experiments Huh7.5.1 cells were plated in 24-well plates at a density of 1×10^5 cells/well the day prior to transfection with apoE siRNA. 72 hours later infection was performed as described previously (25, 27). 72 h later, cells were lysed and HCVpp entry was analyzed by quantitation of luciferase reporter gene expression as described (28).

Analysis of HCV infection and replication. HCV RNA was transcribed from the cDNA of HCV isolate Jc1-Luc as described (23, 24). Huh7.5 cells (cultured in DMEM/10% FCS; Invitrogen) were electroporated with purified transcribed Jc1-Luc RNA with subsequent seeding in 24-well-plates as described (23). For the study of the viral life cycle in cells with silenced ApoE expression, siRNAs and HCV RNA were co-electroporated. HCV replication was analyzed by luciferase activity as described (23, 24). The detection limit of the luciferase assay was 3100 RLU/ μ g protein corresponding to the mean \pm 2 SD of background levels – i. e. luciferase activity of naïve non-replicating cells (averaging $1.9 \pm 0.6 \times 10^3$ RLU/ μ g protein). For infection studies Huh7.5 cells were transfected by electroporation with Jc1-Luc HCV RNA and HCVcc produced as described (23, 24). For infection assays, Huh7.5 cells were seeded at a density of 2×10^4 per well in 24-well plates, and inoculated 24 h later with Jc1-Luc HCVcc (TCID₅₀ between 10^3 and 10^4 /ml). 48 h later, infection was analyzed by quantitation of viral RNA by RT-PCR or viral protein expression using luciferase activity (23, 24).

Co-localization of NS5A and apoE in HCV replicating cells. For indirect immunofluorescence, Huh7.5.1 cells were electroporated with Jc1 HCV RNA (as described above) and 1 ml of cell suspension was distributed on glass coverslips 12-well plates. Seventy two hours post-electroporation, cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS

20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS during 15 min. After rehydration with PBS, cells were incubated for 1 h at room temperature with NS5A and apoE-specific antibodies. The antibodies used in this experiment were diluted in PBS supplemented with 1% BSA as following: 1:250 for rabbit anti-apoE (Epitomics) and 1:10 for mouse anti-NS5A (Virostat); After extensive washing, bound primary antibodies were detected by incubation for 1 h at room temperature in a dark chamber with Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes), both diluted to 1:1000 in PBS supplemented with 1% BSA. DNA was stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). After washing, coverslips were mounted in mounting medium: 80% glycerol (Merck) 20% PBS and 5% (w/v) propyl gallate (Fluka) and studied using a Zeiss Axiovert microscope (Zeiss).

Purification of intracellular or extracellular HCV virions using iodixanol gradients. HCV virions were purified from cell lysates of apoE- or control-silenced cells transfected with Jc1 HCV RNA as described in Gastaminza et al. (29). In brief, iodixanol gradients were prepared using stepwise 10 to 50% iodixanol in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). The lysates (250 μ l) were overlaid on the gradients, and equilibrium was reached by ultracentrifugation for 16 h at 36,000 rpm (135,000 g) in a SW60Ti rotor at 4°C in a Beckman L8-80M preparative ultracentrifuge. Gradient fractions (15 x 250 μ l) were collected from the top. Fractions were characterized for viral RNA content by quantitative RT-PCR and infectivity was assessed by incubation of the fractions with naïve Huh7.5 cells and subsequent detection of infection (72 h postincubation) was assessed by quantitative RT-PCR. For some experiments (Fig. 5D) infectious particles were partially purified by pelleting cell lysates or culture supernatants through a sucrose cushion (20% sucrose in TN buffer) using a SW55Ti rotor (30,000 rpm for 4 h at 4°C) and a Beckman L8-80M preparative ultracentrifuge (26).

Results

ApoE interacts with the HCV NS5A protein in a yeast two-hybrid assay. To investigate HCV-ApoE interactions, we first studied the interaction of apoE with HCV proteins using a yeast two-hybrid system. A yeast two-hybrid assay was constructed using HCV proteins fused to Gal4 DNA binding domain as baits and a full-length apoE fused to the Gal4 activation domain as a prey. Following viral protein-apoE interaction, His3 and beta-galactosidase genes are activated allowing selection on defined media. As shown in Fig. 1, only yeast co-transformed with apoE and HCV NS5A protein was able to grow on selective media. Specificity of this interaction for NS5A was confirmed by absent growth in co-transformation experiments using HCV core and non-structural proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B and NS5B as well as non-related non viral proteins. These results demonstrate that HCV NS5A interacts specifically with full-length apoE in a yeast two-hybrid assay.

ApoE and NS5A co-immunoprecipitate and co-localize in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV. To confirm specific binding of host factor apoE and viral protein NS5A during the HCV life cycle we used a highly efficient HCV cell culture system based on chimeric viral genomes containing a luciferase reporter (Jc1-Luc) (21, 23, 24, 30). Replication-competent HCV RNA derived from isolate Jc1-Luc was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5. Huh7.5 cells containing replicating HCV were lysed and subjected to immunoprecipitation using a monoclonal anti-NS5A antibody. Proteins immunoprecipitated by anti-NS5A were analyzed by immunoblots using anti-apoE antibody 33 (19). As shown in Fig. 2, anti-NS5A antibody specifically co-immunoprecipitated viral protein NS5A together with apoE in lysates from HCV replicating cells. Detection of apoE-NS5A binding was dependent on the concentration of anti-NS5A antibody, since low concentrations of anti-NS5A antibody did not allow detection of NS5A-ApoE binding. In contrast, immunoprecipitations using an anti-myc isotype control antibody (lane 3 and lane 4) did not result in apoE-NS5A co-immunoprecipitation. The validity of the results was further confirmed by an absent immunoprecipitation of apoE using anti-NS5A antibody in Huh7.5.1

cells without replicating virus (Fig. 2; lanes 6-9). These results clearly demonstrate that HCV protein NS5A binds to host cell ApoE in target cells with replicating HCV. It is of interest to note, that the detection of apoE-NS5A binding by co-immunoprecipitation did not require over-expression of apoE or NS5A using cDNA expression constructs but was easily detectable with endogenous apoE present in physiological levels in hepatoma cells and NS5A in expression levels present during viral replication.

To further confirm the role of ApoE-NS5A binding for the viral life cycle, we performed co-localization studies in HCV replicating cells. Replication-competent HCV RNA was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5.1 and expression of apoE and NS5A was investigated by immunofluorescence using specific anti-NS5A and anti-apoE antibodies. As shown in Fig. 3, Huh7.5.1 cells expressed apoE at various levels including cells with high-level expression and cells with virtually absent expression of apoE. Confirming the interaction of NS5A with apoE in living cells, NS5A co-localized with apoE in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV.

ApoE is required for production of infectious HCV particles. To investigate the role of ApoE and the impact of NS5A-apoE interaction in the HCV viral life cycle, we established a protocol for efficient and specific silencing of apoE expression in Huh7.5 cells – a permissive target cell line for HCV infection. To achieve that goal we silenced apoE expression in Huh7.5.1 cells using apoE-specific siRNAs. As shown in immunoblot analyses of transfected cells, transfection of apoE-specific siRNA reproducibly silenced ApoE expression whereas expression of an unrelated protein (beta-actin) was not affected (Fig. 4A, lane 3). In contrast, a pool of negative control siRNAs as well as siRNA targeting the HCV genome did not significantly modulate ApoE expression (Fig. 4A, lanes 1, 2 and 4).

Next, we used this protocol to investigate the role of apoE-NS5A interaction for the viral life cycle. First, we investigated whether silencing of apoE had an impact of production

of infectious viral particles. Replication-competent HCV RNA was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5.1 with silenced ApoE expression or control cells. Four days following electroporation of viral RNA cell culture supernatants of transfected cells (“donor cells”) were pooled and the quantity of infectious viral particles present in supernatants of donor cells was analyzed by incubation of supernatants with naïve Huh7.5.1 cells (“recipient cells”). 72 hours later, infection of recipient cells was assessed by quantitation of luciferase activity or quantitative RT-PCR of the viral genome. As shown in Fig. 4B, supernatants of cells obtained from donor cells with silenced apoE expression showed a markedly reduced or absent infectivity. Similar results were obtained with supernatants of donor cells transfected with siRNA targeting the viral genome. By contrast, supernatants of donor cells transfected with control siRNA pools did not show any modulation of infectivity compared to control donor cells transfected with viral RNA but without siRNAs. These data strongly suggest that apoE silencing results in impaired production of infectious particles. In confirm these results, we investigated the impact of ApoE silencing on two subsequent rounds of infections. Huh7.5.1 cells were transfected with CTRL siRNA, ApoE siRNA or siHCV331. Transfected cells were then infected with recombinant HCV Jc1. 72 hours following infection of infected cells supernatants were used to infect new naïve Huh7.5.1 cells. Again, only silencing of apoE resulted in a marked inhibition of infectivity of supernatants from donor cells (data not shown). These results confirm that apoE is required for production of infectious virions.

ApoE is a host factor required for a late step of the viral life cycle. Next, we mapped the step of the viral life cycle requiring apoE as a host cell factor. It is conceivable, that apoE could be involved in the early infection steps such as entry or replication as well as late steps of the viral life cycle such as assembly or release of viral particles. To exclude an effect of apoE silencing on viral entry we used the well described HCV pseudotype (HCVpp) model established by Bartosch et al (26). HCVpp are useful to test precisely the entry step avoiding thus interference of translation and replication steps. As is shown in the Fig 5A no effect of apoE silencing was observed on HCVpp entry. To confirm this result using the HCVcc model,

we silenced apoE expression in Huh7.5.1 cells prior to infect the cells with HCVcc virions. As shown in Fig.5B apoE silencing did not have a significant impact on HCVcc infection. In contrast, silencing of HCV entry factor CD81 resulted in a marked inhibition of HCVpp (Fig.5A) and HCVcc entry (Fig.5B). These data demonstrate that host cell apoE is dispensable for voral entry.

To investigate a potential effect of apoE silencing on viral replication, Huh7.5.1 cells were electroporated with HCV RNA (Jc1-Luc or Jc1) following transfection of apoE siRNA. Viral replication was analyzed by quantification of luciferase expression or RT-PCR of viral RNA. As shown in Fig. 5C, silencing of apoE expression did not significantly alter replication of the HCV Jc1 genome. To confirm the validity of the experimental set-up, we transfected a recently described antiviral siRNA (siHCV331) shown to inhibit HCV replication by targeting the 5'NTR of the viral genome (31). As shown in Fig. 5C, HCV genome-specific siRNA (si HCV331) markedly inhibited viral replication, with a maximum inhibitory effect observed at 72 hours following electroporation of viral RNA (Fig.5C). Taken together, these results demonstrate that silencing of apoE expression in Huh7.5.1 cells did not modulate HCV replication. This finding is further supported by the results of co-localization studies (Fig. 3) where HCV NS5A protein was also detected in cells with low level or absent apoE. These results confirm that viral replication does not require high-level expression of apoE.

ApoE is involved in release of infectious HCV virions. Since apoE was required for production of infectious viral particles, but did not interfere with viral replication it is likely that ApoE is involved in a step of the viral life cycle occurring post replication. Virus-host interaction post replication steps include viral assembly and release of viral particles from the infected hepatocyte. To address whether apoE was indeed required for assembly and release, we partially purified intracellular infectious viral particles from cellular lysates or infectious particles released into the cell culture supernatants from Jc1 replicating cells by enriching infectious particles through a sucrose cushion using ultracentrifugation. Infectious

particles present in intracellular lysates or cell culture supernatants were analyzed by incubation with naïve Huh7.5 cells. As shown in Fig. 5D, apoE silencing resulted in a marked decrease of infectivity of partially purified particles from cell culture supernatants. In contrast, the infectivity of particles present in cell lysates was enhanced in cells with silenced ApoE expression. These data suggest that apoE silencing results in an impairment of particle release. To confirm this hypothesis, we subjected lysates and supernatants of HCV replicating cells to iodixanol gradient equilibrium ultracentrifugation. Gradient fractions were analyzed for viral RNA using quantitative RT-PCR and infectious viral particles using the above mentioned infectivity assay. Fig. 5 shows the biophysical properties of cell-associated and released virions in our experimental system. The peak infectivity of cell-associated virions displayed a mean density of ~1.15 g/ml similar to previous results describing the presence of cell-associated infectious viral particles (29). A similar density was observed for released virions as shown by Wakita et al. (32). The peaks of viral RNA as well as infectivity in gradient fractions appeared to be similar in cells with and without silenced apoE expression suggesting that apoE silencing does not modify the biophysical properties of infectious viral particles. Similar to the results of experiments assessing infectious viral particles by pelleting through a iodixanol cushion, apoE silencing resulted in a marked decrease of particle infectivity in iodixanol gradient fractions from cell culture supernatants. In contrast, infectivity of gradient fractions obtained from cellular lysates increased in cells with silenced ApoE expression. These data strongly suggest that apoE silencing results in an impairment of particle release as shown by a decrease of infectivity in supernatants and an increase of infectivity in fractions corresponding to intracellular compartments.

Discussion

Using an infectious HCV cell culture system, we demonstrate that apoE binds to HCV non-structural protein NS5A. This conclusion is supported by a specific and easily detectable apoE-NS5A interaction in co-immunoprecipitation and co-localization studies in human hepatoma cells containing replicating infectious HCV as well as a yeast two-hybrid assay (Fig. 1-3).

The HCV NS5A protein is anchored in the reticulum endoplasmic via its N-terminal part (34) and forms 'claw-like' dimers presumably facing away from the membrane where it could accommodate either single- or double-stranded RNA and interact with viral and cellular proteins and membranes (35, 36). According to one hypothesis, multiple NS5A dimers could form a two-dimensional array on intracellular membranes; thereby creating a 'basic railway' that would allow the sliding of RNA. Having identified an easily detectable interaction between apoE and NS5A in HCV replicating cells, it is conceivable that the apoE-NS5A interaction takes place in the vicinity or within of the replication complex and that this interaction results in recruitment of the apoE to the viral assembly modules which results in the production of viral particles released from the infected hepatocyte. The hypothesis of apoE-NS5A interaction within the membranous web is supported by enrichment of the vesicular membranous structures harbouring replicating virus with lipoproteins including apoE (6, 7). This hypothesis is further supported by recent studies demonstrating an important role of NS5A in HCV virion production: NS5A has been shown to be recruited by core-associated lipid droplets in replicating Huh7.5 cells to allow robust infectious particle production (9, 10). Using reverse genetics, the NS5A domain III has been identified as an important viral determinant for virion production (10, 11). The relevance of this domain has been further confirmed by the finding that mutations in NS5A causing an assembly defect can be rescued by trans-complementation (11). Our results identify apoE as a novel host factor interacting with NS5A and point to a novel function of this NS5A binding molecule in postassembly steps of the viral life cycle.

The functional characterization of NS5A-apoE interaction in an infectious cell culture system suggests that apoE is involved in release of viral infectious particles. This conclusion is supported by the finding that apoE silencing results in a marked decrease of released viral particles in the cell culture supernatant of cells containing replicating HCV with concomitant retention of infectious viral particles in the host cell (Fig. 5). ApoE-depleted viral particles purified from the intracellular fraction were still infectious and silencing of apoE rather increased than decreased the level of infectious intracellular retained viral particles. Thus, it seems likely that apoE is not mandatory for infectivity of viral particles but most likely mediates a step that is required for release of infectious viral particles from the infected hepatocyte.

Recent studies have demonstrated evidence that the VLDL pathway appears to play a role for HCV assembly, maturation and egress. Indeed, the membrane vesicles in which HCV replicates are highly enriched in proteins required for VLDL assembly, including apolipoprotein B (apoB), apoE, and microsomal triglyceride transfer protein (6, 7). Moreover, Gastaminza et al., (7) demonstrated that HCV assembly and maturation occur in the endoplasmic reticulum (ER) and post-ER compartments, respectively, in a manner that parallels the formation of very-low-density lipoproteins (VLDL). In addition, it was demonstrated that only low-density particles are efficiently secreted and that immature particles are actively degraded (7). Gastaminza and colleagues postulated that by coopting the VLDL assembly, maturation, degradation, and secretory machinery of the cell, HCV acquires its hepatocyte tropism (7). Complementing these studies, Luo et al (19) demonstrated that HCV infectious virions purified from low density fractions from cell culture supernatants are assembled as apoE-enriched lipoprotein particles and could be precipitated specifically by anti-apoE- and anti-E2 antibodies.

Whereas pharmacological inhibition of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and silencing of apoB expression resulted in a decrease in both released and intracellular infectious particles (7), silencing of apoE expression resulted in an impairment of released viral particles with an accumulation of infectious intracellular particles (Fig. 5D and 6). The different phenotypes suggest that MTP and apoB exert different functions than apoE within the viral life cycle. Whereas MTP and apoB have been shown to be required for particle assembly and maturation (7), the recruitment of apoE to the viral particle appears to be required for particle release - the final step of the viral life cycle. Our results suggest that particle-associated apoE may act as a signal triggering release of viral particles from the infected hepatocyte.

Several studies in HCV-infected patients have shown a statistically significant association between the presence of allelic isoforms of apoE, i.e. the apoE- ϵ 4 allele, and the severity of the HCV-induced liver disease (37, 38). Furthermore, a study of HCV-infected liver transplant recipients (39) showed that recipient, but not donor carriage of at least one ϵ 4 allele was significantly associated with a better histologic outcome in recurrent HCV infection. Furthermore, Mueller et al. (40) observed that the same allele was associated with a poor sustained viral response to interferon- α -based treatment. Taken together, these observations underline the impact of apoE as a host factor playing an important role in the HCV-host interactions and pathogenesis of disease.

Since our results demonstrate that silencing of intracellular apoE results in impaired particle release, it is conceivable that apoE is a novel target for antiviral therapies. Drug-induced decrease of apoE in the liver of the HCV infected patient may represent a novel approach for control of viral infection.

Acknowledgements

The authors thank Joachim Lupberger (Inserm U748) for performing HCVpp infections, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Charles M. Rice, Frank V. Chisari for providing HCV strains and human hepatoma cell lines, and Kunitada Shimotohno, Jean Dubuisson and Ralf Bartenschlager for helpful discussions.

Figure Legends

Fig. 1. Interaction of HCV protein NS5A with full-length apoE in a yeast two-hybrid assay. **(A)** Principle of the yeast two-hybrid screen: in this system, interaction between two proteins is indicated by the activation of the reporter genes HIS3 and ADE2, which allow growth on HIS3- ADE- plates **(B)** AH 109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of the full length ApoE and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding the fusions between the DNA binding domain of Gal4 and HCV proteins (core, NS2, NS3, NS4B, NS5A and NS5B) and control protein laminin or the Gal4 DNA activation domain only. After two weeks at 30°C on selective Histidine depleted media yeast growth is analysed. **(C)** AH 109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of HCV core protein and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding NS5A of H77 or JFH1 strains. **(D)** AH 109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of the full-length apoE protein and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding fusions between the DNA binding domain of Gal4 and wild-type NS5A from strains JFH1 or H77 or NS5A derived from strain JFH1 containing a mutation in domain III resulting in abolishment of particle production.

Fig. 2. Co-immunoprecipitation of apoE and HCV NS5A protein in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV. Full-length replication-competent HCV RNA derived from isolate Luc-Jc1 was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5. 72 h post-transfection Huh7.5 cells containing replicating HCV were lysed and subjected to immunoprecipitation using a monoclonal anti-NS5A or an unrelated control monoclonal anti-myc antibody as described in Materials and Methods. Proteins immunoprecipitated by anti-NS5A or control antibody were analyzed by immunoblot using anti-apoE antibody 33 (1/500) and horseradish-peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibody. Positions of molecular size standards (in kilodaltons) are shown at the right of the panel, immunoprecipitated proteins are indicated on the left with an arrow.

Fig. 3. Co-localization of apoE with HCV NS5A in Jc1 replicating Huh7.5.1 cells.

Huh7.5.1 cells were electroporated with Jc1 HCV RNA genome as described in Materials and Methods. 72 hours later, cells were fixed and stained for apoE and NS5A expression using rabbit anti-apoE antibody and Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (green fluorescence) and anti-NS5A antibody and Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti-mouse IgG (red fluorescence) as described in Materials and Methods. Nuclei were stained in blue (DAPI; left upper panel). Co-localization of stained proteins is shown in the right lower panel.

Fig. 4. Silencing of apoE expression in Huh7.5.1 cells results in inhibition of HCV particle production (A)

Silencing of apoE expression in Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs as described in Materials and Methods. Western blot analysis of siRNA mediated down-regulation of apoE expression in Huh7.5 cells. Lysates of control naïve Huh7.5 (Ctrl), Huh7.5 cells expressing control siRNA (Ctrl siRNA) or siRNA targeting the HCV genome were subjected to SDS-PAGE. Immunoblotting was performed using rabbit anti-ApoE antibody (1/4000) and HRP-conjugated anti-rabbit antibodies (1/1000) or mouse anti-beta-actin monoclonal antibodies (1/5000) and HRP-conjugated anti-mouse antibodies (1/1000). The presence or absence of apoE and beta-actin is indicated on the right, and molecular weight (MW) markers (kDa) are indicated on the left. **(B)** Inhibition of HCV particle production in Huh7.5 cells with silenced apoE expression. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs and HCV Jc1-Luc RNA as described in material and method. Cell culture supernatants of mock or siRNA-Jc1-luc transfected Huh7.5.1 cells were pooled and concentrated 50 times 72 hours following transfection of HCV Jc1-luc RNA. Concentrated supernatants (150 µl) were then used to infect 6×10^4 naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity of siCTRL or siapoE treated cell supernatants were quantified by measurement of luciferase activity in Huh7.5 lysates 72 hours after infection (mean \pm SD; n = 4).

Fig. 5. Impact of apoE silencing on entry, replication and release of HCV Luc-Jc1.

Huh7.5 cells were electroporated with siRNA targeting apoE (siApoE) and CD81 (siCD81)

expression, irrelevant control RNAs (siCTRL) or an siRNA efficiently targeting HCV translation (siHCV331). 48 hours later Huh7.5 cells were infected with HCVpp **(A)** or HCVcc Jc1-Luc **(B)** or **(C)** re-electroporated with 10 µg Jc1-Luc. Seventy two hours later HCV entry or 24-96h replication was assessed by quantitation of luciferase activity (mean ± SD; n = 4). The results are expressed as a percentage of entry (A) or infection (B) or RLU per µg of protein (C). **(D)** Supernatants (SN) or lysates (LYS) from cells treated with siCTRL (black bars) or siApoE (grey bars) were subjected to iodixanol gradient ultracentrifugation and pelleted particles were used to infect naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity was assessed by quantitative RT-PCR normalised with GAPDH RNA quantification in parallel (mean ± SD; n = 4).

Fig. 6. Infectivity of purified intracellular or extracellular HCV virions partially purified by iodixanol equilibrium gradient ultracentrifugation. Cells were transfected with siCTRL or siApoE. 48 hours later Jc1 RNA was electroporated. Cell lysates **(A)** or concentrated (50 x) cell culture supernatants **(B)** were subjected to 10 to 50% iodixanol step gradients and subjected to equilibrium ultracentrifugation as described in Materials and Methods. Fractions obtained from gradients with siCTRL treated (in black) or siApoE (in grey) cells were measured for RNA content by qRT-PCR quantification (lines) and tested for infectivity on naïve Huh-7.5 cells (bars). Infectivity was measured 72 hours later by qRT-PCR quantification. RNA cell extraction was normalised with GAPDH quantification. Mean and SD of three independent experiments. The dotted line represents the density (in g/ml) of each fraction.

References

1. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20(1):1-16.
2. Collett MS. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992 Jul;15(3):145-154.
3. Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 2006 Sep;44(3):527-535.
4. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007 Jun;5(6):453-463.
5. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004 Jan;39(1):5-19.
6. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007 Apr 3;104(14):5848-5853.
7. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *J Virol* 2008 82(5):2120-2129.
8. Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 2007 Aug;88(Pt 8):2204-2213.

9. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 2007 Dec 21;282(51):37158-37169.
10. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007 Sep;9(9):1089-1097.
11. Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008 Mar;4(3):e1000035.
12. Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2000 Sep 24;1(1):507-537.
13. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988 Apr 29;240(4852):622-630.
14. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001 Apr;12(2):151-157.
15. Maugeais C, Tietge UJF, Tsukamoto K, Glick JM, Rader DJ. Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice. *J Lipid Res* 2000 Oct 1;41(10):1673-1679.
16. Gusarova V, Seo J, Sullivan ML, Watkins SC, Brodsky JL, Fisher EA. Golgi-associated Maturation of Very Low Density Lipoproteins Involves Conformational Changes in Apolipoprotein B, but Is Not Dependent on Apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2007 Jul 6;282(27):19453-19462.

17. Cedazo-Minguez A. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007 Nov 30;11(6):1227-1238.
18. Cattin L, Fiscicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, et al. Polymorphism of the Apolipoprotein E Gene and Early Carotid Atherosclerosis Defined by Ultrasonography in Asymptomatic Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jan 1;17(1):91-94.
19. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007 Dec;81(24):13783-13793.
20. Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 2003 May;77(9):5401-5414.
21. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 9;103(19):7408-7413.
22. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007 Dec;46(6):1722-1731.
23. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006 Jun;80(11):5308-5320.

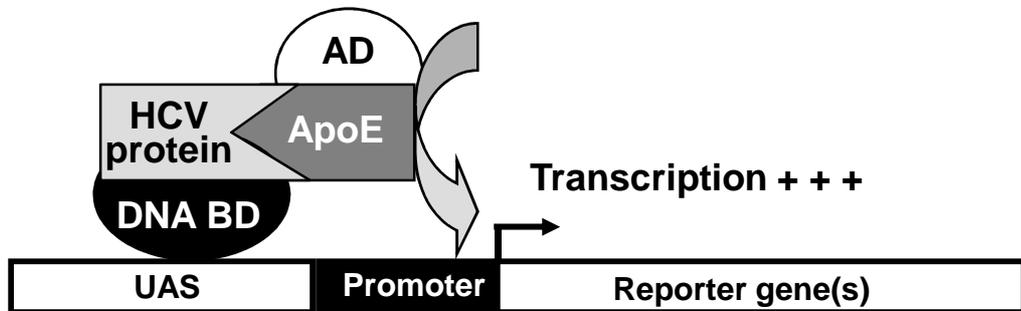
24. Dimitrova M, Affolter C, Meyer F, Nguyen I, Richard DG, Schuster C, et al. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 21;105(42):16320-16325.
25. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 3;104(14):6025-6030.
26. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003 Mar 3;197(5):633-642.
27. Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 2008 Nov;135(5):1719-1728.
28. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006 Jun;80(11):5308-5320.
29. Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006 Nov;80(22):11074-11081.
30. Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 2008 Nov;135(5):1719-1728.

31. Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, et al. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Sep 21;361(2):294-300.
32. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 Jul;11(7):791-796.
33. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences* 2006 Aug;31(8):445-454.
34. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2004 Sep 24;279(39):40835-40843.
35. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 2005 May 19;435(7040):374-379.
36. Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005 Oct 28;280(43):36417-36428.
37. Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* 2002 Aug;36(2):456-463.
38. Price DA, Bassendine MF, Norris SM, Golding C, Toms GL, Schmid ML, et al. Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut* 2006 May;55(5):715-718.

39. Toniutto P, Fabris C, Fumo E, Apollonio L, Caldato M, Mariuzzi L, et al. Carriage of the apolipoprotein E-epsilon4 allele and histologic outcome of recurrent hepatitis C after antiviral treatment. *Am J Clin Pathol* 2004 Sep;122(3):428-433.
40. Mueller T, Gessner R, Sarrazin C, Graf C, Halangk J, Witt H, et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 2003 Dec;38(6):1592-1593.
41. Siest G, Zaoui M, Visvikis S. Human apolipoprotein E concentration in response to diseases and therapeutic treatments. 56 ed. 2002. 95-110.
42. Fujita N, Kaito M, Kai M, Sugimoto R, Tanaka H, Horiike S, et al. Effects of bezafibrate in patients with chronic hepatitis C virus infection: combination with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006 Jul;13(7):441-448.
43. Di M, V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, et al. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 2004 Dec;40(6):1426-1433.
44. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 2006 Jul;44(1):117-125.
45. Torres DM, Harrison SA. HCV replication and statin pleiotropism: an adjuvant treatment panacea? *Am J Gastroenterol* 2008 Jun;103(6):1390-1392.
46. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, et al. Targeting Lipid Metabolism in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *J. Infect. Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-370.

Figure 1

A



B

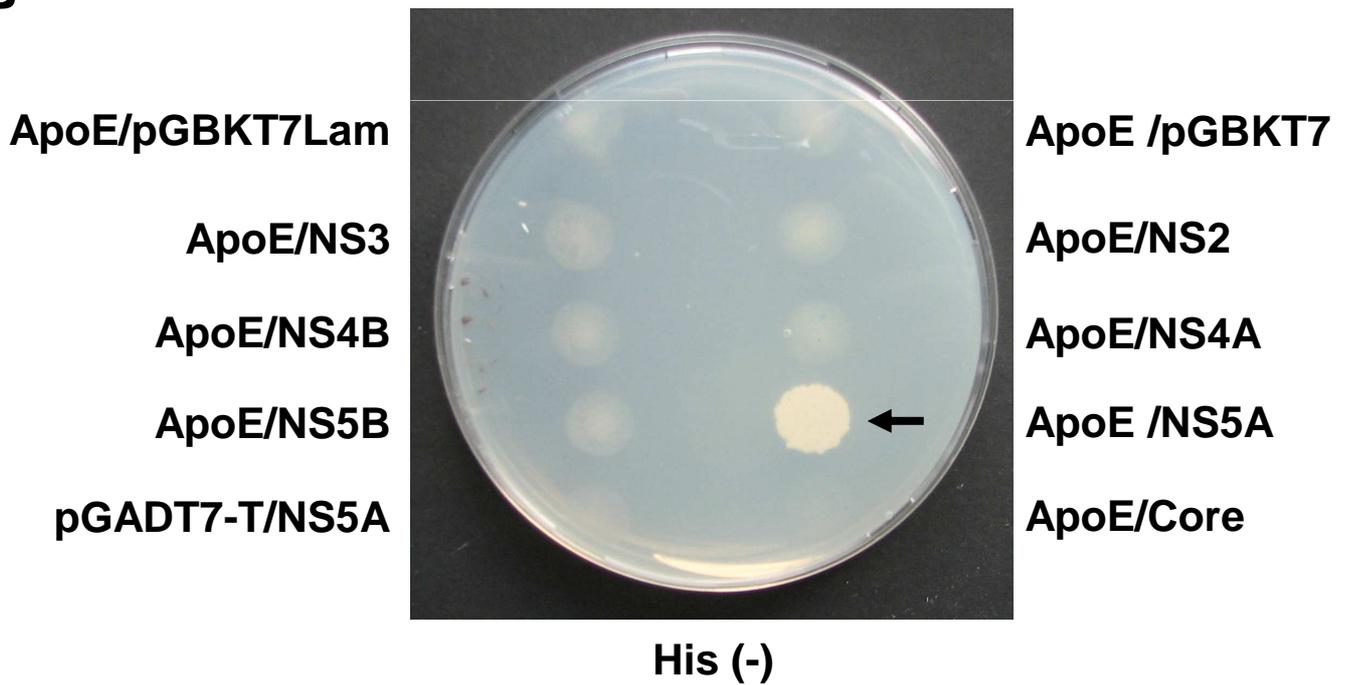


Figure 2

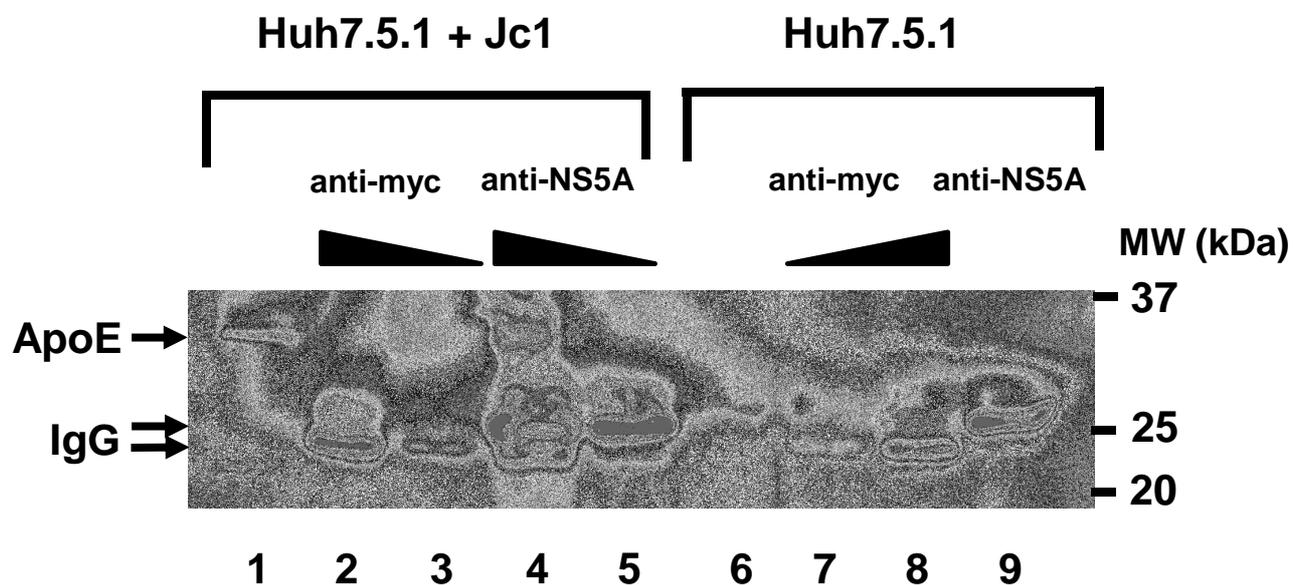


Figure 3

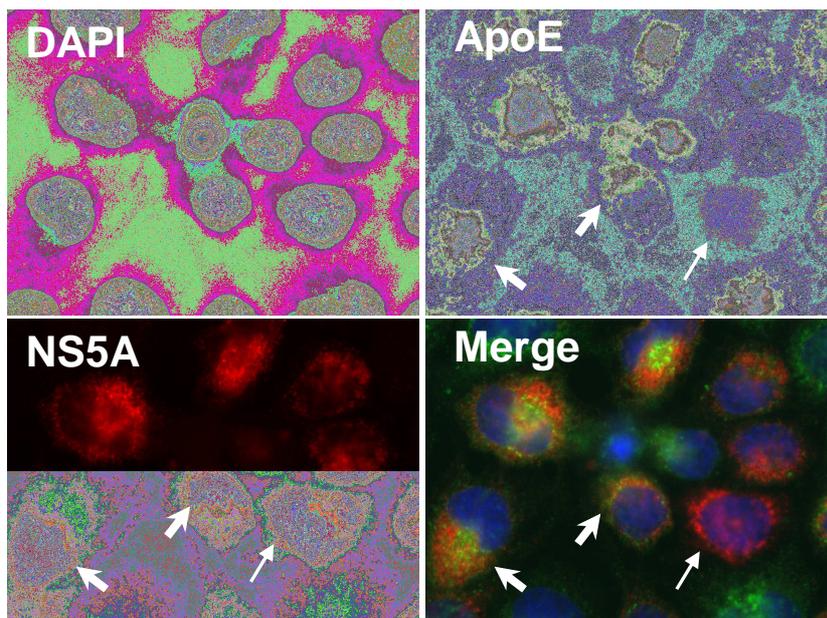
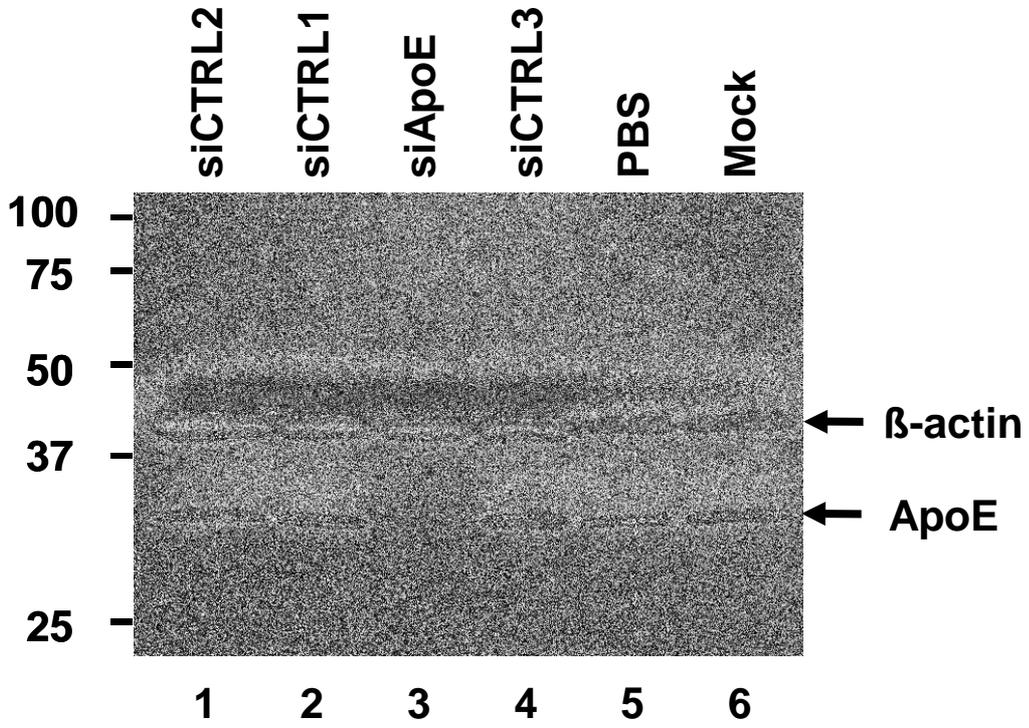


Figure 4

A



B

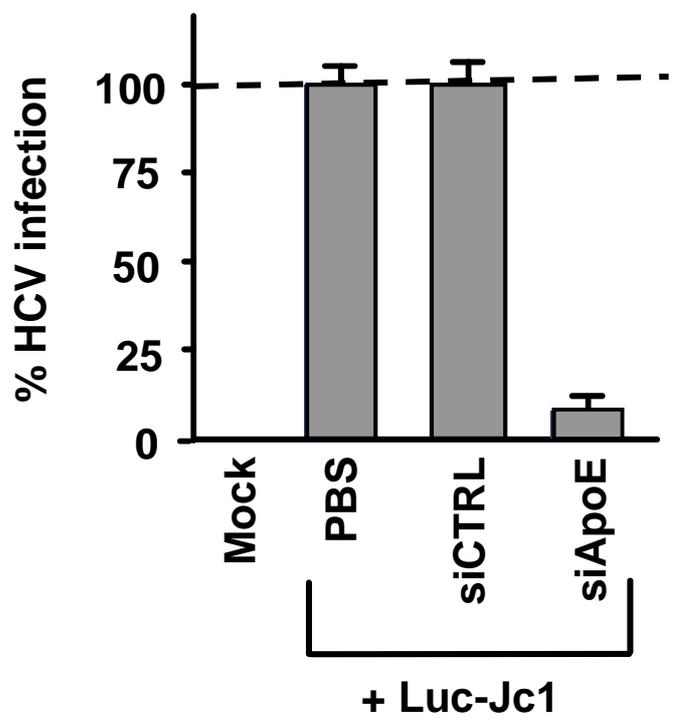


Figure 5

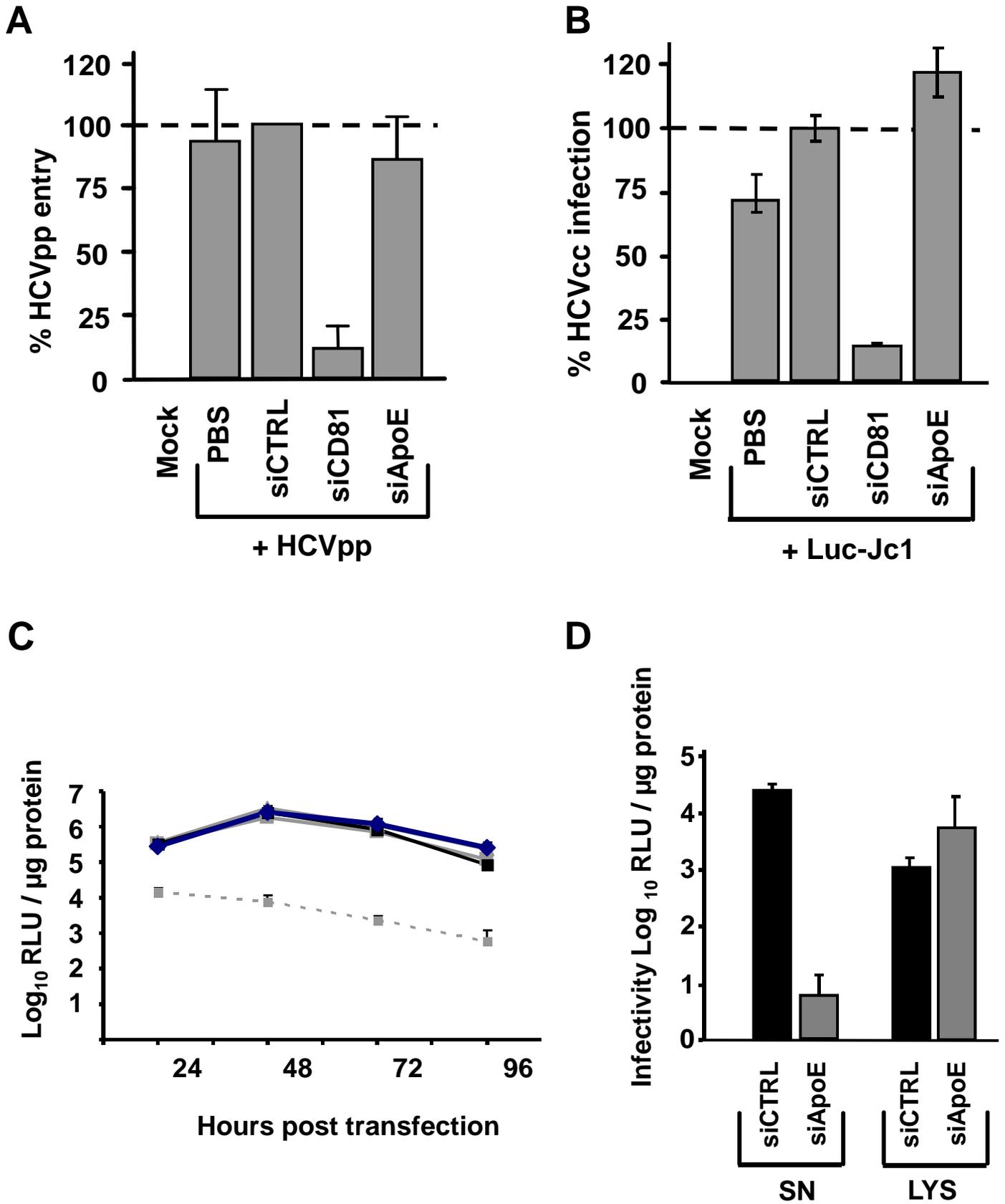
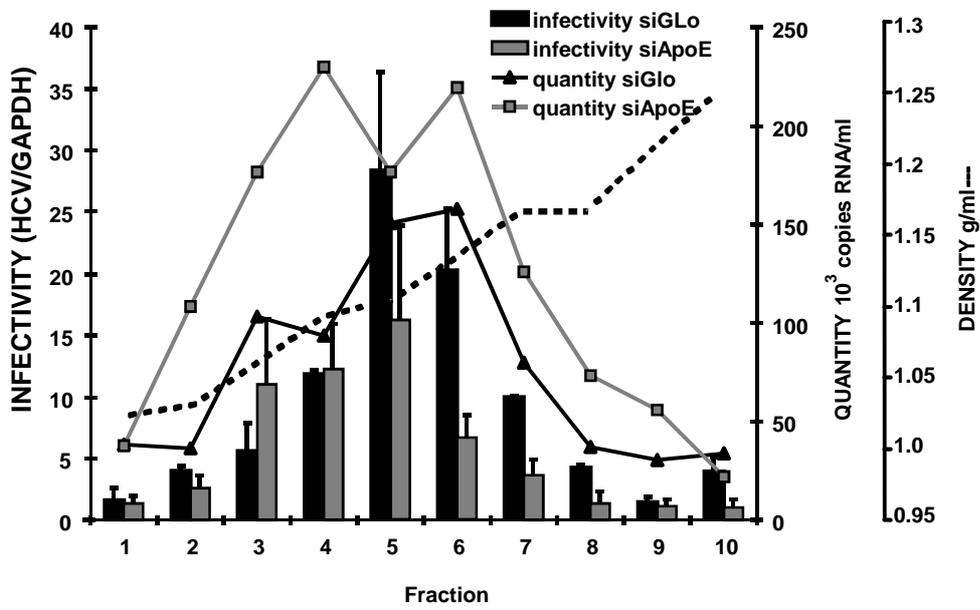
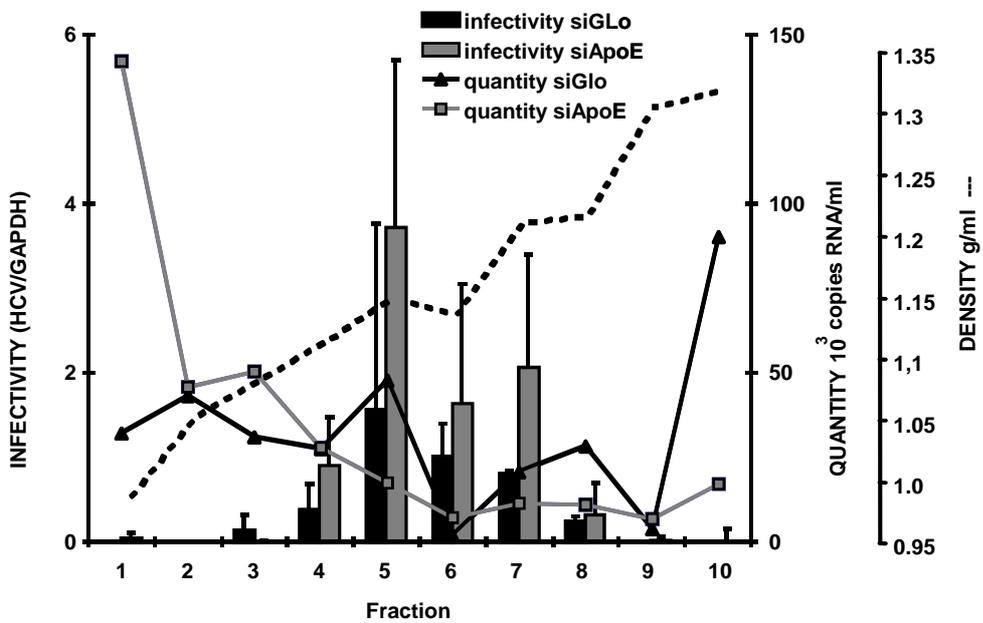


Figure 6

A



B



Résumé

La formation du complexe de réplication du virus de l'hépatite C est une étape-clé dans le cycle viral. Nous avons précédemment montré que les 220 derniers nucléotides de l'extrémité 3' du brin (-) se replient en cinq tiges-boucles stables formant le domaine I (Schuster et al. 2002, J. Virol, 76:8058-68). La comparaison des sites d'initiation de la réplication des brins moins (-) et plus (+) a révélé des caractéristiques communes notamment une forte homologie entre la tige-boucle SLEI du brin (-) et la tige-boucle SLII du brin (+). Dans le but d'investiguer la fonction de la tige-boucle SLEI dans le cycle viral et les interactions hôte-virus, nous avons criblé des protéines cellulaires interagissant avec SLEI par la méthode du triple-hybride dans la levure, SLEI servant d'appât et une banque d'ADNc de foie humain de proie. Un mutant de la séquence homologue a servi de contrôle négatif pour confirmer la spécificité de l'interaction. Ce criblage a identifié une forme tronquée de l'Apolipoprotéine E (ApoE) comme une protéine hépatocytaire interagissant avec la tige-boucle SLEI du brin (-). Pour évaluer la pertinence fonctionnelle de cette interaction, nous avons bloqué l'expression de l'ApoE par de petits ARN interférents spécifiques (siARN) dans des cellules Huh7.5 transfectées avec l'ARN génomique complet de la souche Jc1 du VHC. L'extinction de l'expression de l'ApoE a entraîné une forte inhibition de la production de particules infectieuses sans affecter le niveau de réplication du virus. Ces résultats indiquent que SLEI pourrait recruter ApoE au niveau du complexe de réplication et que ce recrutement est important pour l'accomplissement du cycle viral aboutissant à la production de particules infectieuses. Pour mieux comprendre le mécanisme d'intervention de l'ApoE, nous avons recherché une interaction entre les protéines virales et ApoE par la méthode du double-hybride dans la levure. Seule, la protéine non structurale NS5A du VHC interagit avec ApoE dans ce système d'étude. Cette interaction a été confirmée par des analyses d'immunoprécipitation dans des cellules Huh7.5 répliquant Jc1. Pour discriminer si ApoE intervient spécifiquement dans la sécrétion des virions ou plus précocement dans leur assemblage, nous avons évalué l'infectivité de particules virales récoltées à partir de surnageants de culture ou des lysats de cellules Huh7.5 répliquant Jc1 dans lesquelles l'expression de l'ApoE a été bloquée par des siARN spécifiques. Les particules virales récoltées ont été purifiées et concentrées au moyen de gradients d'iodixanol puis utilisées pour infecter des cellules Huh7.5 naïves. Les particules virales provenant des lysats cellulaires sont plus infectieuses que celles issues de surnageants de culture cellulaire. Nos résultats démontrent une forte implication de l'ApoE dans la sécrétion des virions du VHC et en font une cible intéressante pour la thérapie antivirale.

Mots-clé: *Apolipoprotéine E, SLEI, Virus de l'Hépatite C, production de particules infectieuses*

Summary

Formation of the hepatitis C virus (HCV) replication complex represents a key step in the viral life cycle. We have previously demonstrated that the last 220 nucleotides of the HCV 3' minus strand fold into five stable stem-loops forming domain I (Schuster et al. 2002, J. Virol, 76:8058-68). Comparison of the replication initiation sites on minus (-) and plus (+) strands revealed common structural features including a marked sequence homology between stem loop EI (SL-EI) of (-) strand and the (+) strand stem loop II. Aiming to investigate the function of SL-EI for the viral life cycle and virus-host interactions, we screened cellular proteins interacting with SL-EI using a yeast three-hybrid assay with SL-EI as bait and a human liver cDNA library as prey. A reverse mutant of the homologous sequence was used as a negative control to confirm specificity of the interaction. The yeast three-hybrid screen identified a truncated part of apolipoprotein E (ApoE) as a hepatocyte protein interacting specifically with SL-EI of HCV (-) strand. To investigate the functional relevance of this interaction, we silenced ApoE expression by siRNAs in Huh7.5 cells transfected with HCV Jc1 full-length RNA. Silencing of ApoE expression resulted in a marked inhibition of infectious particle production without affecting the level of viral replication. These results indicate that SL-EI may recruit ApoE to the viral replication complex and that this recruitment may play a role for completion of the viral life cycle resulting in production of infectious particles. In order to gain more insights in the mechanism, we checked an interaction between the viral proteins and ApoE by yeast two hybrid assay. Only the HCV non structural protein NS5A was found to interact with ApoE in this system. This interaction was confirmed in Huh7.5 cells replicating Jc1 by co-immunoprecipitation. To discriminate between an effect of ApoE on secretion of infectious virions or more early on their assembly, we evaluated the infectivity of intra- or extra-cellular viral particles produced in HCV Jc1 replicating Huh7.5 cells in which ApoE was silenced. Virions were purified on iodixanol gradients and then used to infect naive Huh7.5 cells. We found that particles obtained from cells lysates were more infectious than those obtained from cell supernatants. These results show a specific impact of ApoE on virions secretion. Taken together, our results support a strong involvement of ApoE in the HCV secretion pathway and identify this protein as an interesting target of HCV antiviral therapy.

Key Words: *Apolipoprotein E, Stem-Loop EI, Hepatitis C Virus, infectious virion production*