

UNIVERSITÉ LILLE 1- SCIENCES ET TECHNOLOGIES
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

CENTRE D'INFECTION ET D'IMMUNITÉ DE LILLE (CIIL)
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (IPL)

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Lille 1 - Sciences et Technologies

Par

Khaled ALSALEH

**Rôle des acides aminés basiques de la
partie N-terminale de la protéine de capsid dans
l'assemblage du virus de l'hépatite C**

Soutenue publiquement le 21 décembre 2010

Devant le Jury composé de :

Dr. Jean-Claude MICHALSKI

Pr. Philippe ROINGEARD

Dr. Philippe DESPRÈS

Dr. Anne OP DE BEECK

Dr. Czeslaw WYCHOWSKI

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

À ma grande famille
Ma raison d'exister

À ma deuxième famille
Mes collègues du labo

Et

إلى وردتي الناعمة رائحة الجمال
أحبك حبا " جما يا زهرتي الغالية

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse, Jean-Claude Michalski, Philippe Roingard, Philippe Desprès, Anne Op De Beeck et Czeslaw Wychowski, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux.

Je remercie Jean Dubuisson de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de son laboratoire et pour son soutien scientifique et moral. Dans ton labo, on apprend, à côté de la recherche scientifique, la culture écologique (comment utiliser le moins possible de gobelets pour ne pas polluer la planète).

Je remercie mon directeur de thèse Czeslaw Wychowski pour son orientation et support pendant ces quatre années passées au laboratoire. Vous m'avez beaucoup apporté scientifiquement et humainement. Je vous remercie également pour votre soutien moral pendant ma thèse. Je vous ai très souvent entendu dire « vous inquiétez pas, tout se passera bien!! ». ».

Merci à mes voisines de bureau Laurence et Gabrielle qui me coincent des deux côtés, dès le début de la rédaction de ma thèse, pour leur bonne humeur. J'ai adoré les menaces de Laurence de me faire des gros câlins si je fais des bêtises et moi je n'arrête pas d'en faire. J'ai apprécié de travailler à côté de Gaby à la paillasse, surtout quand elle me la laissait.

Merci à Lucie et Birke pour les magnifiques voyages qu'on a faits à Nausicaa, Strasbourg et Lausanne. Je n'oublierai jamais ces moments et surtout de me rappeler chaque fois qu'on prenait une décision que je représente une minorité masculine. Merci à Anna, Noémie et Julie pour leur bonne humeur exceptionnelle et leur agréable compagnie pendant les sorties.

Un merci spécial à mon camarade de thèse Pierre-Yves. Je me souviendrai toujours de la bonne ambiance qu'on créait ensemble, et surtout ton costume rigolo d'escrime. J'espère que tu vas continuer de nous faire la bibliographie cinématographique de temps en temps. Tu resteras toujours mon grand pig.....?

Merci à André mon fournisseur officiel de cellules et d'anticorps pour les IF. Merci à Sophana pour son aide, particulièrement en informatique, et le montage des figures (que par fois, on croit que certaines d'entre elles sont destinées à la publication dans un magazine people).

Merci à Claire, Karine, Xavier, Nathalie et son harcèlement en douceur (à la Belge) pour faire des pots où l'on se trouve tous autour de la même table comme une grande famille. Merci à Yves et son aide indispensable dans la préparation des figures de microscopie confocale , et à lui encore et à Sandrine pour m'accompagner tard au labo et me demander assez souvent à quelle page je suis dans ma thèse (in Fields).

Merci à toutes les autres personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse: Philippe, Ioan, les deux Julien, David, François, Sadia, Pauline, Caroline, Valentina, Vera, Yann. Merci à Marie-Christine pour son soutien administratif et le travail colossal qu'elle fait avec calme.

Je vous remercie tous pour la bonne ambiance au labo et les relations humaines sincères. Loin de ma famille, vous étiez ma vraie famille dans ce pays que j'ai adoré, je l'adore et je l'adorerai pour très long temps.

Merci à tous les ami(e)s que j'ai rencontré ici en France et les bon moment qu'on a passé ensemble pendant deux ans à Paris.

Enfin, un petit mot et quelque statistique pour ma grande famille dans mon pays lointain, la Syrie. Un grand merci à vous tous pour votre soutien pendant toutes ces années, particulièrement à mes parents qui vieillaient pour que j'arrive au but ; mes cinq frères, mes deux sœurs, mes quatre belle sœurs, mes deux beaux-frères et encore pour mes douze nièces et neveux (la vache, heureusement qu'on apprend à calculer à l'école). Je vous aime tous, vous donnez un sens à ma vie.

Résumé

Le virus de l'hépatite C (HCV) touche environ 3% de la population mondiale constituant un problème majeur de santé publique. Son génome est un ARN de polarité positive code dix protéines virales : les protéines structurales (C, E1 et E2) qui participent à la formation des virions, et les protéines non-structurales (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont nécessaires à la réplication du génome viral. La protéine de capsid (C) du HCV est le composant essentiel de la nucléocapsid. La séquence nucléotidique de son extrémité N-terminale est structurée avec l'IRES et formant des éléments importants pour la traduction/réplication virale appelés SL V et SL VI. La partie N-terminale de la protéine C (les premiers 120 aa) est un domaine hydrophile riche en aa basiques qui s'étendent principalement sur deux régions comprises entre les aa 6 à 23 et 39 à 65. Dans des systèmes acellulaires, la multimérisation de la capsid et l'interaction capsid-ARN ont été attribuées à ce domaine et ces résidus basiques. Cependant, leur importance dans le cycle viral demeure inconnue.

Pour évaluer le rôle de ces aa basiques dans l'infectiosité du HCV en culture cellulaire, ceux-ci ont été modifiés en alanine, d'abord par groupe, lorsque plusieurs aa étaient concernés, puis individuellement lorsque certains d'entre eux se révélaient importants. Les mutants résultant de la mutagenèse dirigée ont été étudiés dans le contexte de la souche infectieuse JFH1 du virus de l'hépatite C de génotype 2a. Nos résultats montrent que les mutations comprises entre les aa 6 à 23 diminuent l'infectiosité du VHC en culture cellulaire. Cependant, le virus était toujours capable de se propager en culture cellulaire. Nos résultats confirment également que la séquence nucléotidique de cette région est impliquée dans le fonctionnement de l'IRES viral, nécessaire à la traduction des protéines virales.

Par ailleurs, les mutations de la deuxième région (aa 39 à 65) affectent la production des particules virales infectieuses du HCV lorsqu'elles sont mutées en 2-3 aa. L'étude de l'effet individuel de chaque aa basique de cette région a permis d'identifier quatre acides aminés basiques (R50, K51, R59 et R62) cruciaux pour la production des particules virales infectieuses. La modification de ces résidus n'a pas d'effet sur la localisation subcellulaire de la protéine C, l'interaction protéine capsid-ARN, l'oligomérisation de la protéine de capsid et son enveloppement par les membranes intracellulaires.

Collectivement, nos données suggèrent que les acides aminés basiques R50, K51, R59 et R62 jouent un rôle majeur dans la formation des particules virales infectieuses au niveau d'une étape précoce avant la formation des particules virales infectieuses intracellulaires.

Abstract

With about 3% of people infected worldwide, hepatitis C is a major public health problem. Its positive single-strand RNA genome encodes at least 10 mature viral proteins that can be divided into: structural proteins (C, E1 and E2) that participate in the formation of infectious virions, and nonstructural proteins (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) required for viral replication. The core protein C is an essential component of the nucleocapsid. Its N-terminal coding sequence is structured with the viral IRES that contain elements, called SL V and SL VI, important for viral RNA translation/replication. The N-terminal end of the core protein (first 120 aa) is a hydrophilic domain rich in basic amino acids, which are concentrated in two clusters (aa 6 to 23) and (aa 39 to 65). In cell free systems, this domain and its basic residues have been proposed to be involved in core multimerization and RNA binding. However, their exact role in the viral cycle is still unknown.

Using alanine-scanning mutagenesis in the context of the infectious strain JFH1, we studied the impact of those clusters on the viral life cycle. First, they were mutated by groups of 2 or 3 aa and then individually when it is necessary. Our results showed that changing amino acids of the first cluster (aa 6 to 23) by groups of 2 or 3 aa decreased virus infectivity but the virus was still able to propagate in cells. In addition, we confirmed the involvement of the core coding sequence in the IRES function and viral proteins translation.

Moreover, mutation of the second basic cluster (aa 39 to 65) by groups of 2 or 3 aa led to loss of intracellular and extracellular infectious virus, in spite of successful translation, suggesting that these mutations inhibited virus assembly and secretion. To determine whether one or more basic residues were involved, they were modified separately. Only four basic amino acids residues of the second cluster (R50, K51, R59, and R62) were essential for the production of infectious viral particles. Mutation of these residues did not interfere with core subcellular localization, core-RNA interaction or core oligomerization. In addition, these mutations had no effect on core envelopment by intracellular membranes.

Together, these data indicate that R50, K51, R59, and R62 residues play a major role in the formation of infectious viral particles at an early step before the formation of intracellular infectious viral particle.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	13
---	-----------

LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
------------------------------------	-----------

I. INTRODUCTION.....	21
-----------------------------	-----------

A. L'HEPATITE C.....	21
-----------------------------	-----------

<i>1. Découverte.....</i>	<i>21</i>
---------------------------	-----------

<i>2. Épidémiologie.....</i>	<i>21</i>
------------------------------	-----------

<i>3. Modes de transmission.....</i>	<i>22</i>
--------------------------------------	-----------

<i>4. L'évolution de la maladie.....</i>	<i>23</i>
--	-----------

<i>4.1. L'hépatite aiguë.....</i>	<i>23</i>
-----------------------------------	-----------

<i>4.2. L'hépatite chronique.....</i>	<i>24</i>
---------------------------------------	-----------

<i>5. La réponse immunitaire.....</i>	<i>25</i>
---------------------------------------	-----------

<i>5.1. La réponse immunitaire innée.....</i>	<i>25</i>
---	-----------

<i>5.2. La réponse immunitaire adaptative.....</i>	<i>26</i>
--	-----------

<i>❖ La réponse immunitaire humorale :.....</i>	<i>26</i>
---	-----------

<i>❖ La réponse immunitaire cellulaire.....</i>	<i>27</i>
---	-----------

<i>6. Thérapies.....</i>	<i>30</i>
--------------------------	-----------

<i>6.1. Traitement actuel : IFN/ribavirine.....</i>	<i>30</i>
---	-----------

<i>6.2. Nouveaux traitements.....</i>	<i>31</i>
---------------------------------------	-----------

<i>6.3. Perspective de vaccination.....</i>	<i>34</i>
---	-----------

B. LE VIRUS DE L'HEPATITE C.....	36
---	-----------

<i>1. Classification et variabilité génomique.....</i>	<i>36</i>
--	-----------

<i>2. La particule virale.....</i>	<i>39</i>
------------------------------------	-----------

<i>3. Organisation du génome.....</i>	<i>40</i>
---------------------------------------	-----------

3.1. La région 5' non-codante	40
3.2. Le cadre ouvert de lecture.....	41
3.3. La région 3' non-codante	41
4. <i>Les protéines virales</i>	42
4.1. La protéine de capsid C.....	43
4.2. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	43
4.3. La protéine p7.....	45
4.4. La protéine NS2.....	45
4.5. Les protéines NS3 et NS4A	46
4.6. La protéine NS4B.....	48
4.7. La protéine NS5A.....	49
4.8. La protéine NS5B.....	52
5. <i>Modèles d'études</i>	53
5.1. Les modèles animaux	53
5.2. Les modèles cellulaires.....	54
❖ Les réplicons	54
❖ Les pseudo-virions du HCV et les virosomes.....	56
❖ Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines E1 et E2 du HCV	56
❖ Les particules virales complètes produites en culture cellulaire (HCVcc).....	58
6. <i>Cycle viral</i>	61
6.1. L'attachement et l'entrée dans les hépatocytes.....	62
❖ Les récepteurs du HCV.....	63
➤ La protéine CD81.....	63
➤ La protéine SR-BI.....	63
➤ Les protéines claudines (CLDN)	64
➤ La protéine Occludine (OCLN).....	64
❖ L'internalisation et la fusion	66
6.2. La synthèse des protéines virales	66
6.3. La réplication virale.....	67
6.4. L'assemblage et la sécrétion virale.....	69
❖ Les étapes précoces de l'assemblage.....	69
❖ Rôle des protéines non-structurales.....	70

❖ Rôle des lipides	71
C. LA PROTEINE DE CAPSIDE (C) DU HCV	73
1. <i>Biogenèse et propriétés de la protéine C</i>	73
2. <i>La nucléocapside du HCV</i>	74
3. <i>Modèles d'étude de l'assemblage de la nucléocapside</i>	75
4. <i>Association de la protéine C aux gouttelettes lipidiques (GLs)</i>	77
5. <i>Interaction protéine C/ARN génomique et encapsidation</i>	79
6. <i>Rôle de la Protéine C dans la traduction et la réplication virales</i>	80
7. <i>Interaction Protéine C/cellule hôte</i>	82
8. <i>Les autres protéines codées par la séquence codant de la protéine C</i> ...83	
8.1. <i>La protéine F ou ARFP</i>	83
8.2. <i>La protéine minicore</i>	84
II.OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	89
III.RESULTATS.....	93
<i>ARTICLE</i>	93
IV.DISCUSSION	111
A. <i>ROLE LIMITE DES AA BASIQUES DE 6 A 23 POUR L'INFECTIOSITE DU HCV</i>	111
B. <i>CARACTERISATION DES AA BASIQUES 39 A 62 : UN ROLE CRUCIAL POUR L'INFECTIOSITE</i>	113
C. <i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	117
V.BIBLIOGRAPHIE	123

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Prévalence du HCV dans le monde.....	22
Figure 2 : Evolution d'une hépatite causée par le HCV.....	24
Figure 3 : Réponse immunitaire cellulaire adaptative au cours de l'infection aiguë par le HCV29	
Figure 4 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae.....	36
Figure 5 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences codantes complètes des différents génotypes du HCV.....	37
Figure 6 : Répartition des différents sous-types du HCV dans le monde.....	38
Figure 7 : Représentation schématique d'une particule du HCV.....	39
Figure 8 : Organisation génomique du HCV.....	40
Figure 9 : Structure de la région 3'NC de l'ARN génomique du HCV.....	42
Figure 10 : Structure et associations membranaires des protéines du HCV.....	42
Figure 11 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2.....	44
Figure 12 : Structure 3D de la protéine NS2.....	46
Figure 13 : Structure de la protéase NS3/NS4A.....	47
Figure 14 : Topologie de la protéine NS4B par rapport à la membrane du RE.....	49
Figure 15 : La protéine NS5A.....	51
Figure 16 : Structure 3D de la protéine NS5B.....	53
Figure 17 : Représentation schématique des réplicons du HCV.....	55
Figure 18 : Représentation schématique de la production des HCVpp.....	57
Figure 19 : Représentation schématique de la production de HCVcc.....	60
Figure 20 : Cycle viral putatif du HCV.....	62
Figure 21 : Modèle d'entrée du HCV et sa modulation par certains facteurs cellulaires.....	65
Figure 22 : Représentation schématique de l'interaction entre la tige boucle 5BSL3.2 et la région 3'X-tail.....	68
Figure 23 : Modèle d'assemblage du HCV.....	72
Figure 24 : Les différents domaines de la protéine de capsid.....	74
Figure 25 : Le domaine D2 de la protéine de capsid et son association aux membranes.....	78
Figure 26 : Structure et éléments de la région 5'NC et la protéine C du génome de HCV.....	81
Figure 27 : Détection par immuno-empreinte de la protéine de capsid dans des lysats de cellules Huh-7 transfectées avec l'ARN transcrit des mutants.....	117

Figure 28 : Les sites potentiels de méthylation localisés entre les aa 39 à 62..... 119

Tableau 1 : Nouveaux traitements STAT-C anti-HCV en essai clinique. 33

Tableau 2 : Les principaux vaccins thérapeutiques et prophylactiques anti-HCV qui sont
actuellement en étude clinique 35

Liste des abréviations

A

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Alb-uPA	Albumin-urokinase plasminogen activator
ApoB/E	Apolipoprotéine B/E
ARFP	Alternative deading frame protein
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase

C

Cardif	CARD adapter inducing interferon
CD81	Cluster differentiation 81
CIDE-B	Cell death-Inducing DFFA-like effector B
CLDN	Claudine
C-terminal	Carboxy-terminal

E

EMCV	Encephalomyocarditis virus
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
EWI-2wint	EWI-2 without its N-terminus

F

F	Frameshift protein
FKBP8	FK506-binding protein

G

GAG	Glycosaminoglycane
GBF-1	Golgi-associated brefeldin A-resistant factor 1
GBV	GB virus
GFP	Green fluorescent protein
GLs	Gouttelettes lipidiques
GTPase	Guanosine triphosphatase

H

HAV	Hepatitis A virus
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma

HCV	Hepatitis C virus
HCVcc	HCV produced in cell culture
HCVpp	HCV pseudoparticles
HDL	High density lipoproteins
HIV	Human immunodeficiency virus
HL	Hydrophobic loop
hnRNP L	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
Hsp90	Heat shock protein 90
HVR	Hypervariable region
hVAP-A	Human vesicle-associated membrane protein-associated protein A
hVAP-B	Human vesicle-associated membrane protein-associated protein B

I

IFN	Interféron
IPS-1	Interferon promoter stimulator protein 1
IRES	Internal ribosomal entry site

J

JAK-STAT	Janus kinase-signal transducers and activators of transcription
JFH-1	Japanese fulminant hepatitis-1 isolate

L

LDL	Low density lipoproteins
LDL _{ox}	Oxidised LDL
LDLR	Low density lipoproteins receptor
LPL	Lipoprotéine lipase
LTR	Long terminal repeat

M

MAVS	Mitochondrial antiviral signaling
MLV	Murine leukemia virus
MTP	Microsomal triglyceride tranfer protein
MVA	Modified vaccinia virus Ankara
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)

N

NANBH	Non-A non B hepatitis
NIs	Nucleoside inhibitors
NK	Natural killer
NNIs	Non-nucleoside inhibitors
NS	Non-structural protein
NSAP1	NS1-associated protein 1
N-terminal	Amino-terminal

NTP Nucleoside triphosphate
NTPase Nucleoside triphosphatase

O

OAS 2',5'-oligoadenylate synthetase
OMS Organisation mondiale de la santé
ORF Open reading frame

P

PBS Primer binding site
PEG Polyethylene glycol
PKR Protein kinase R
PPAR- λ Peroxisome proliferators-activated receptors-gamma
PPT Polypurine tract

R

RdRb RNA-dependent RNA polymerase
RE Réticulum endoplasmique
RIG-1 Retinoïc acid-inducible gene I
RNS Reactive nitrogen species
ROS Reactive oxygen species

S

SAA Serum amyloid A
SCID Severe combined immunodeficiency
SFV Semliki forest virus
SL (I \rightarrow VI) Stem loop (I \rightarrow VI)
SP Signal peptidase
SPP Signal peptide peptidase
SR-BI Scavenger Receptor classe B type I
STAT-C Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV

T

TLR Toll like receptor
TRIF Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor Inducing Interferon

T

TMD Transmembrane domain

V

VISA	Virus-Induced-Signaling Adapter
VLDL	Very low density lipoproteins
VLP	Virus-like particles
Vps4	Vacuolar protein sorting-associated protein 4
VSV	Vesicular stomatitis virus

3' NC	3' non-codante
5' NC	5' non-codante

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

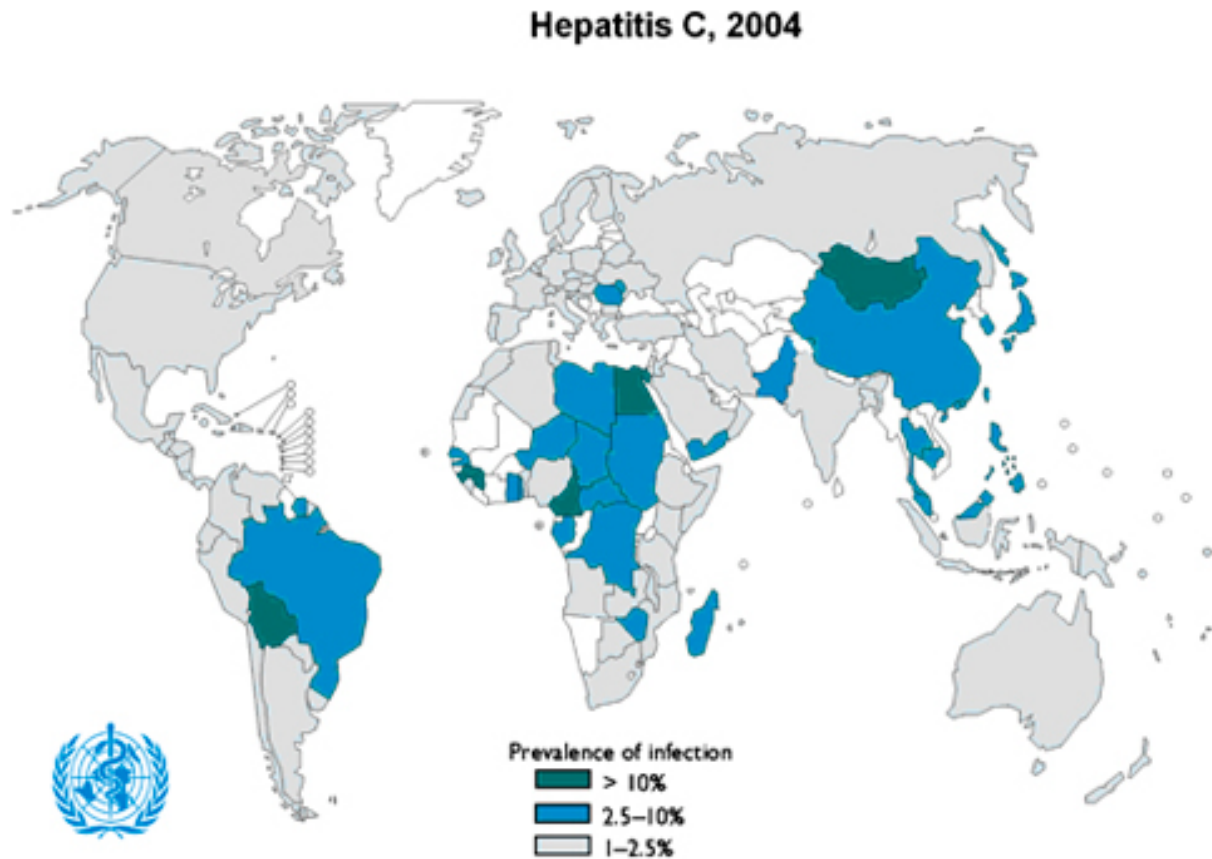
A. L'HEPATITE C

1. Découverte.

À la fin des années 1960 et au début des années 1970, deux agents viraux avaient déjà été identifiés comme responsables d'une hépatite. Ils ont été dénommés : virus de l'hépatite B (HBV) et virus de l'hépatite A (HAV). Cependant, les tests sérologiques utilisés à l'époque montraient que des hépatites post-transfusionnelles étaient négatives pour ces deux virus. Ces cas furent désignés comme des hépatites Non-A, Non-B (NANBH) (Feinstone *et al.*, 1975; Prince *et al.*, 1974). Au milieu des années 1980, les études physicochimiques réalisées sur l'un de ces agents ont démontré que celui-ci était enveloppé et avait un diamètre d'environ 50-80 nM (Bradley *et al.*, 1983; Feinstone *et al.*, 1983; He *et al.*, 1987). L'utilisation du chimpanzé, comme modèle d'étude (Alter *et al.*, 1978; Hollinger *et al.*, 1978), a permis à Choo et collaborateurs, de l'équipe de Michael Houghton, d'identifier, par des méthodes de biologie moléculaire, l'agent à l'origine de ces cas d'hépatite non-A, non-B (Choo *et al.*, 1989). Le séquençage de son génome a révélé qu'il appartenait à la famille des *Flaviviridae*. Ce virus est appelé maintenant virus de l'hépatite C (HCV).

2. Épidémiologie

Selon l'estimation de l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), 130 à 170 millions de personnes sont chroniquement infectées par le HCV ce qui représente environ 2,2 à 3% de la population mondiale (Lavanchy, 2009; Shepard *et al.*, 2005; W.H.O, 2000). Cependant, cette prévalence varie géographiquement d'une région à l'autre (Figure 1). Les pays en voie de développement, d'Afrique et d'Asie, ont la prévalence la plus élevée par rapport aux pays développés du nord-ouest de l'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie. L'Egypte est le pays présentant le taux le plus élevé au monde (15 à 20%) alors que celui-ci se situe entre 0,01 à 1% au Royaume-Uni et en Scandinavie (Frank *et al.*, 2000; Lavanchy, 2009; Shepard *et al.*, 2005). En France, environ 1% de la population générale est chroniquement infecté par le HCV (Dubois *et al.*, 1997).



D'après (Lavanchy, 2009))

Figure 1 : Prévalence du HCV dans le monde.

3. Modes de transmission

La transmission parentérale du HCV constitue le mode de contamination le plus fréquent (Lavanchy, 2009). La transfusion du sang et de ses dérivés étaient la voie prédominante dans la transmission du HCV jusqu'à la fin des années 1980. Dans les pays développés, ce mode de transmission a diminué considérablement grâce aux mesures de surveillance des dons du sang (Alter, 2007; Shepard *et al.*, 2005). Cependant, il subsiste encore dans les pays en développement principalement à cause de l'absence des moyens de contrôle sur les dons du sang (Shepard *et al.*, 2005). Actuellement, la toxicomanie et l'utilisation illégale des drogues sont la principale source de contamination par le HCV dans les pays industrialisés. L'incidence de la contamination chez les nouveaux toxicomanes est de 15 à 30% par an (Alter, 2002; Des Jarlais *et al.*, 2003). En France, environ 27% des donneurs de sang, testés positifs pour le HCV, avaient une histoire de toxicomanie intraveineuse (Elghouzzi *et al.*, 2000).

La transmission chez les professionnels de santé est aussi possible. Elle est principalement due à des piqûres avec des aiguilles contaminées (Yazdanpanah *et al.*, 2005). La transmission nosocomiale est un problème majeur dans les pays en développement. Elle relève de la réutilisation du matériel médical contaminé ou insuffisamment stérilisé (Alter, 2007). D'autres modes de transmission ont été également décrits comme certaines pratiques cosmétiques, religieuses et culturelles (tatouage, piercing, scarifications rituelles, la circoncision, et l'acupuncture). La transmission par voie périnatale ou sexuelle est rare (Alter, 2007; Shepard *et al.*, 2005; van de Laar *et al.*, 2010).

4. L'évolution de la maladie

L'hépatite C est une maladie d'évolution chronique puisque la majorité des personnes infectées développe une forme persistante de l'infection qui peut durer plusieurs dizaines d'années. La phase finale de cette maladie dans certains cas est la cirrhose voire le carcinome hépatocellulaire (HCC) (Figure 2).

4.1. L'hépatite aiguë

Après une période de 2 à 12 semaines, l'infection par le HCV entraîne une hépatite aiguë souvent asymptomatique (Maheshwari *et al.*, 2008). Cette infection se caractérise par la détection, dans le sang des patients, de l'ARN viral, l'augmentation de l'activité des alanine aminotransférases (plus de 10 fois la concentration normale) et la séroconversion 6-8 semaines plus tard (Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Chung, 2005). Coïncidant avec l'élévation de l'alanine aminotransférase sérique, les symptômes qui peuvent accompagner cette forme aiguë de l'hépatite comprennent : fatigue, fièvre, nausée, douleur abdominale, vomissements, coloration sombre de l'urine et ictère (Chen & Morgan, 2006; Maheshwari *et al.*, 2008). Seulement, 15 à 30% des personnes infectées guérissent spontanément. Ces personnes avaient le plus souvent une infection aiguë avec une faible virémie (Figure 2) (Lemon *et al.*, 2007). Être de sexe féminin ou être infecté par le HCV de génotype 3 semble favoriser cette guérison spontanément (Bakr *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2004). La progression de l'infection vers une forme fulminante est extrêmement rare.

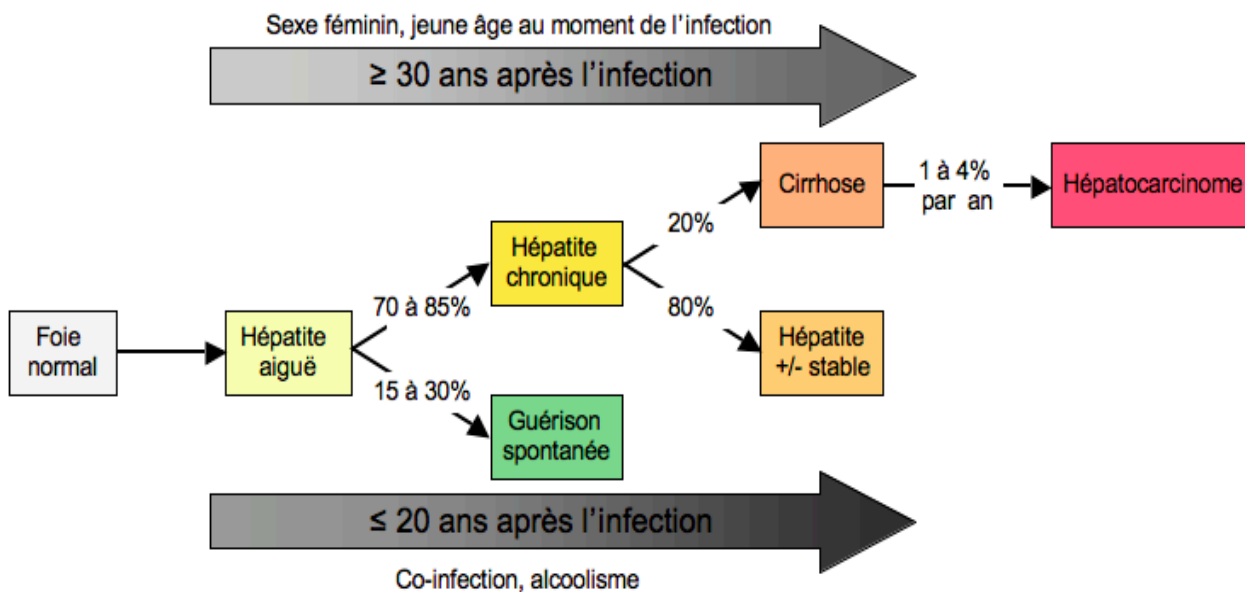


Figure 2 : Evolution d'une hépatite causée par le HCV.

4.2. L'hépatite chronique

La forme chronique de l'hépatite C se traduit par la persistance de l'ARN viral plus de 6 mois après l'apparition de l'infection. Le taux de chronicité varie selon l'âge, le sexe, les groupes ethniques et la réponse immunitaire. Dans 70 à 85% des cas d'hépatite C, la maladie évolue vers une hépatite chronique qui peut durer pendant des décennies (Figure 2) (Hoofnagle, 2002). Selon certaines études, l'infection chronique peut être asymptomatique ou s'accompagner de manifestations telles que la fatigue physique ou mentale, l'irritabilité, des douleurs abdominales, la perte d'appétit, des nausées, des diarrhées, des douleurs articulaires et musculaires (Lang *et al.*, 2006). Le diagnostic de l'hépatite chronique se fait par la recherche de l'ARN viral et des anticorps anti-HCV (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Les analyses histologiques constituent un autre moyen pour confirmer le diagnostic et évaluer la progression de la maladie et le pronostic (Hoofnagle, 2002; Lemon *et al.*, 2007). Les complications majeures associées à l'hépatite chronique sont : la stéatose, la fibrose, la cirrhose et le HCC (Kenny-Walsh, 1999; Niederau *et al.*, 1998; Piodi *et al.*, 2008). Environ 20% des patients chroniquement infectés développent une cirrhose 20-30 ans après le début de l'infection. La progression vers la cirrhose est accélérée chez les personnes âgées lors de l'infection, les personnes alcooliques et celles qui sont co-infectées par le HIV et/ou le HBV. Entre 1 à 4% des patients atteints par la cirrhose développent un HCC (Figure 2) (EASL, 1999; Lauer & Walker, 2001; Tsukuma *et al.*, 1993).

5. La réponse immunitaire

Comme pour toute infection par des microorganismes étrangers au corps humain, une réponse immunitaire est déclenchée contre le HCV. Le virus est d'abord contrôlé par les effecteurs de l'immunité innée (les cytokines et les cellules « Natural Killer » NK) qui constituent la première ligne de défense. Activées par les cytokines produites par les cellules infectées, les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) stimulent une réponse immunitaire adaptative (humorale et cellulaire) en activant la différenciation des lymphocytes B et T.

5.1. La réponse immunitaire innée

Une à deux semaines après l'infection par le HCV, le virus induit de la stimulation des différents composants de l'immunité innée. Plus spécifiquement, l'infection active les cellules « Natural Killer » (NK) et induit la sécrétion de protéines antivirales, notamment l'interféron (IFN) de type 1 générant un état antiviral.

La première réponse des cellules infectées par le HCV est la production de l'IFN- β , initiée par deux récepteurs, TLR-3 et RIG-I. TLR-3 est un senseur d'ARN double brin au niveau des endosomes, alors que RIG-I est une ARN hélicase cellulaire qui reconnaît les régions structurées des extrémités 5' et 3' non-codantes (voir I.B. 3.1 et 3.3) du génome viral (Saito *et al.*, 2008; Sumpter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Leur activation induit des cascades de signalisations cellulaires conduisant à la synthèse et la sécrétion de l'IFN- β . L'interaction de l'IFN- β (ou en général de l'IFN de type 1) avec ses récepteurs active la voie de signalisation JAK-STAT menant à l'expression de nombreux gènes (environ 300 gènes) dont OAS, PKR et des cytokines entraînant ainsi un état antiviral non-spécifique dans les cellules infectées et non-infectées (Bigger *et al.*, 2001; Feld & Hoofnagle, 2005). Cependant, le virus de l'hépatite C a élaboré plusieurs mécanismes pour contourner l'effet antiviral de l'IFN. La protéase NS3/NS4A est capable de cliver les protéines Cardif (appelée également MAVS, VISA ou IPS-1) et TRIF, deux protéines adaptatrices dans les voies de signalisation de RIG-I et TLR-3 respectivement (Li *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2005b; Meylan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). D'autre part, la protéine NS5A inhibe l'activité de la protéine kinase R (PKR) dépendante des ARN bicaténaires, perturbant la réponse antivirale liée à l'ARN double brin (Gale *et al.*, 1997; Kriegs *et al.*, 2009; Pflugheber *et al.*, 2002). La protéine de capsid est aussi capable de moduler la réponse immunitaire innée par son interaction avec STAT1 dans la voie de signalisation de l'IFN (Bode *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006).

Les cellules NK jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire innée contre l'hépatite C via leur activité cytotoxique et leur production de cytokines antivirales. En effet, des cas de clairance spontanée ont été décrits chez des chimpanzés infectés par le HCV sans le développement d'une réponse immunitaire spécifique au virus (Thomson *et al.*, 2003). Le virus est également capable de contourner l'activité de ces cellules. Les cellules NK des patients infectés surexpriment des récepteurs inhibiteurs et des cytokines qui atténuent la réponse immunitaire adaptative par la suite (Jinushi *et al.*, 2004). D'autre part, une étude a montré que la glycoprotéine E2 libre inhibe *in vitro* les cellules NK par son interaction avec le récepteur CD81 présent à leur surface (Crotta *et al.*, 2002). Cependant, l'effet de E2 n'a pas été confirmé dans le contexte du virus infectieux (Yoon *et al.*, 2009).

Les cellules dendritiques (DCs) font partie de la réponse immunitaire innée et forment un lien entre l'immunité innée et adaptative par leur rôle comme cellules présentatrices d'antigènes. Leur activation par les cytokines sécrétées lors de la réponse immunitaire innée déclenche la réponse adaptative. Chez les patients chroniquement infectés, l'impact du virus sur le nombre et les fonctions de ces cellules reste controversé (pour revue (Rehermann, 2009)).

5.2. La réponse immunitaire adaptative

Comme pour d'autre virus, la réponse immunitaire adaptative anti-HCV fait intervenir des composantes humorales et cellulaires. La réponse immunitaire humorale est caractérisée par l'apparition des anticorps anti-HCV produits par les lymphocytes B, alors que la réponse cellulaire est caractérisée par le développement de lymphocytes T spécifiques du HCV. Plusieurs semaines s'écoulent entre l'infection et l'installation de la réponse immunitaire adaptative.

❖ *La réponse immunitaire humorale :*

Les anticorps anti-HCV deviennent détectables plusieurs semaines après l'infection par le virus. Ceux-ci sont dirigés contre des protéines structurales et non-structurales. Les protéines d'enveloppe présentes à la surface des virions sont la cible des anticorps neutralisants (Bartosch *et al.*, 2003a; Keck *et al.*, 2007; Logvinoff *et al.*, 2004). La région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine E2 (voir I.B.4.2) constitue une cible privilégiée pour les anticorps neutralisants dirigés contre le HCV. Cependant, ceux-ci sont généralement

spécifiques d'un nombre limité d'isolats (Farci *et al.*, 1996). D'autres anticorps neutralisants ciblant différentes régions de E2 ont été également décrits prouvant l'existence d'épitopes neutralisants en dehors de la région HVR1 (Keck *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2008). Il semble en fait que, dans les premiers temps de l'infection, les anticorps neutralisants soient plutôt dirigés contre HVR1, alors que les anticorps neutralisants à spectre large n'apparaissent que bien plus tard au cours de l'infection (von Hahn *et al.*, 2007).

Le rôle de ces anticorps dans la clairance de l'infection est controversé. Des études, menées sur des chimpanzés infectés, ont montré leur capacité à bloquer l'infection (Farci *et al.*, 1994). Dans d'autres études, aucune protection contre la réinfection par des souches homo- ou hétérologues n'a été obtenue avec de tels anticorps (Farci *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 1994). De plus, des cas de résolution spontanée de l'infection sans production d'anticorps ont été rapportés (Logvinoff *et al.*, 2004; Post *et al.*, 2004). Des anticorps neutralisants ont été également détectés chez les patients chroniquement infectés. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Par exemple, l'apparition des quasi-espèces au niveau des épitopes ciblés par les anticorps représenterait un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire humorale (Farci *et al.*, 1996; von Hahn *et al.*, 2007). L'interaction entre les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les glycoprotéines du HCV pourrait, en facilitant l'entrée virale, assurer une protection contre des anticorps neutralisants (Bartosch *et al.*, 2005; Dreux *et al.*, 2006; Voisset *et al.*, 2006). Des études récentes ont montré que certains glycanes de la glycoprotéine E2 protègent contre les anticorps neutralisants (Helle *et al.*, 2007). Finalement, l'attachement au virus d'anticorps non-neutralisants peut également empêcher la neutralisation (Zhang *et al.*, 2007).

❖ *La réponse immunitaire cellulaire*

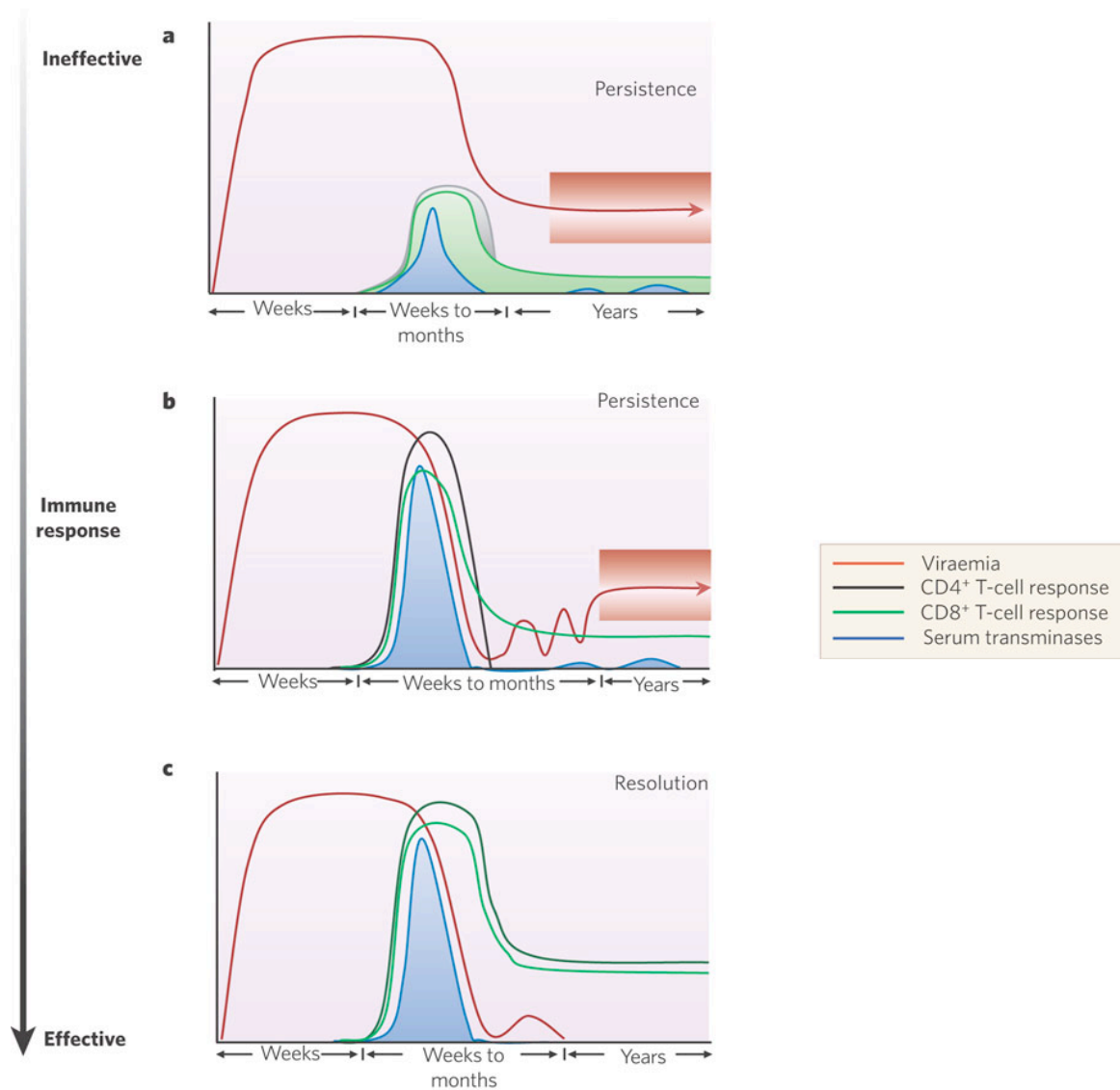
Contrairement aux anticorps, la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ est essentielle pour la lutte contre l'infection (Figure 3). Plusieurs études ont montré qu'une réponse CD4⁺ et CD8⁺ anti-HCV est associée à la résolution de l'infection (Day *et al.*, 2002; Gruner *et al.*, 2000; Lechner *et al.*, 2000; Thimme *et al.*, 2001).

De nombreux travaux ont indiqué que la clairance du virus est caractérisée par une réponse cellulaire CD4⁺ anti-HCV multispécifique (Day *et al.*, 2002; Gerlach *et al.*, 2005). Chez les chimpanzés, la déplétion des lymphocytes CD4⁺ au cours de l'infection aiguë conduit à la chronicité (Grakoui *et al.*, 2003). La qualité de la réponse immunitaire des CD4⁺

semble jouer un rôle dans l'évolution de l'infection. En effet, la résolution de l'infection est accompagnée d'une réponse CD4+, rapide et forte, qui semble persister pendant plusieurs années. Inversement, cette réponse est faible, retardée voire transitoire pour une hépatite chronique (Aberle *et al.*, 2006; Takaki *et al.*, 2000). Pour des infections résolues, différents épitopes sont reconnus par les CD4+ sur les protéines non-structurales, alors que pour une hépatite chronique leur nombre est limité (Day *et al.*, 2002).

Les cellules CD8+ se révèlent également importantes pour la résolution spontanée de l'infection et elles sont multi-épitopes, comme pour les CD4+ (Gruner *et al.*, 2000; Lechner *et al.*, 2000; Shoukry *et al.*, 2003). En revanche, cette réponse est faible et cible moins d'épitopes chez les patients chroniquement infectés (Lauer *et al.*, 2004). Les CD8+ agissent par deux mécanismes : le premier est cytolytique pour tuer les hépatocytes infectés, et le deuxième est lié à la sécrétion de cytokines antivirales comme l'IFN- γ (Thimme *et al.*, 2001). Les mécanismes utilisés par les CD8+ pour contrôler l'infection du HCV restent peu connus. Plusieurs travaux ont indiqué que la réponse CD8+ associée à la production de l'IFN- γ pourrait contribuer à la clairance de l'infection (Takaki *et al.*, 2000; Thimme *et al.*, 2002; Thimme *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'IFN- γ est capable d'inhiber la réplication des réplicons HCV sous-génomiques dans des hépatocytes (Frese *et al.*, 2002). Cependant, une étude récente a montré que le traitement de l'infection chronique par l'IFN- γ n'a pas d'effet sur la charge virale (Shin *et al.*, 2005). Il semble donc que l'effet de l'IFN- γ sur l'évolution de l'infection soit fortement lié à la qualité de la réponse immunitaire cellulaire.

La réponse immunitaire cellulaire CD4+ et CD8+ joue donc un rôle important dans l'évolution de l'infection par le HCV. Le dysfonctionnement de ces cellules et le contournement de leur rôle dans le contrôle de l'infection par le virus conduisent à la chronicité et la persistance de l'hépatite C. Ainsi, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'échappement du virus : i) l'épuisement ou l'anergie des T CD4+ et T CD8+ par un niveau élevé de réplication virale et la stimulation permanente des lymphocytes T (Bowen & Walker, 2005), ii) le développement des lymphocytes T régulateurs (appelés également Treg) qui inhibent la réponse antivirale, iii) l'absence d'une reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T CD8+ due aux mutations introduites dans le génome par l'ARN polymérase ARN dépendant (pour revue (Ishii & Koziel, 2008)).



(D'après (Bowen & Walker, 2005))

Figure 3 : Réponse immunitaire cellulaire adaptative au cours de l'infection aiguë par le HCV

a) La virémie (courbe rouge) augmente rapidement et, bien qu'elle diminue après ce pic initial, elle n'est jamais contrôlée. Il s'ensuit l'établissement d'une infection chronique avec une virémie variable chez les différents patients. Dans ces conditions, les réponses CD4+ et CD8+ (courbe noire et verte respectivement) ainsi que le niveau des transaminases sériques (courbe bleue) évoluent peu et peuvent être faibles, voire absentes. Les courbes pleines indiquent que les réponses peuvent être variables chez les différents patients. **b)** La virémie persiste pendant plusieurs semaines en absence de réponse immunitaire détectable. L'apparition des réponses CD4+ et CD8+ est associée à un contrôle temporaire de la virémie ainsi qu'à des variations du niveau des transaminases sériques. Toutefois, après la chute de la réponse CD4+, la virémie réapparaît et devient persistante. Une réponse CD8+ peut rester détectable malgré l'infection chronique. **c)** Bien que la virémie apparaisse rapidement et que les réponses cellulaires apparaissent tardivement, le virus devient indétectable dans le plasma après l'apparition des réponses CD4+ et CD8+ qui coïncide souvent avec un niveau de transaminases sériques variable. Un rebond de la virémie peut avoir lieu avant la clairance virale.

6. Thérapies

À l'heure actuelle, le seul traitement disponible contre l'hépatite C est une combinaison entre l'interféron alpha et la ribavirine. Cependant, les études approfondies faites sur le cycle viral et les fonctions des protéines du HCV ont conduit à la découverte de plusieurs cibles thérapeutiques importantes dans la lutte contre le HCV. Ainsi, de nombreuses molécules anti-HCV prometteuses sont en voie de développement.

6.1. Traitement actuel : IFN/ribavirine

L'IFN- α pégylé (PEG-IFN- α) utilisé dans le traitement de l'hépatite C est une forme de l'IFN- α liée à une molécule polyéthylène-glycol (PEG). Cette conjugaison a permis d'améliorer la stabilité de l'IFN, de réduire la fréquence des doses à une par semaine, d'augmenter le taux d'une réponse virologique prolongée et de limiter les effets secondaires associés au traitement (Davis & Lindsay, 2005). La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine. Actuellement, la combinaison PEG-IFN- α /ribavirine, utilisée pour traiter l'hépatite C, est administrée pendant 48 semaines (pour les HCV de génotypes 1, 4, 5 et 6) ou 24 semaines (pour ceux de génotypes 2 et 3) (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Les différences dans la durée du traitement sont liées à l'efficacité de la combinaison PEG-IFN- α /ribavirine par rapport aux génotypes traités. L'efficacité du traitement se constate par l'absence d'ARN viral après 24 semaines de la fin du traitement (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Ainsi, l'efficacité varie entre 40 et 50% chez les patients infectés par les HCV de génotypes 1, 4, 5 et 6, alors qu'elle peut dépasser 80% chez les patients infectés par ceux de génotypes 1 et 2 (Ascione *et al.*, 2010; Fried *et al.*, 2002; Maieron *et al.*, 2010; von Wagner *et al.*, 2005). Malgré une efficacité limitée du traitement pour certains génotypes, l'hépatite C reste une des rares infections virales chroniques qui peut être éliminée par les antiviraux.

Le traitement de l'hépatite C par l'IFN- α induit probablement des effets antiviraux similaires à ceux provoqués par l'interféron endogène, par l'activation de l'expression de nombreux gènes déclenchant ainsi un état antiviral sur les cellules infectées (Feld & Hoofnagle, 2005). Le mécanisme par lequel la ribavirine exerce son effet n'est pas encore bien connu. La ribavirine possède une activité antivirale contre plusieurs virus à ARN et ADN. Cependant, son activité anti-HCV est transitoire, faible et de courte durée lorsqu'elle est utilisée toute seule, alors qu'elle est plus efficace en association avec l'interféron (Pawlotsky *et al.*, 2004). Son effet anti-HCV pourrait être le résultat d'un effet

immunomodulateur couplé à un effet antiviral par son analogie à la guanosine (Feld & Hoofnagle, 2005).

6.2. Nouveaux traitements

Compte tenu actuellement de l'efficacité limitée des traitements anti-HCV, des effets secondaires et de la durée d'administration des différents composés, la recherche de nouveaux traitements est un enjeu majeur dans la lutte contre cette infection.

Une des pistes suivie est l'amélioration de la combinaison IFN/ribavirine. L'Albuferon- α (ou aussi appelé Albinterféron) et la Viramidine sont actuellement en phase finale d'étude clinique. L'Albuferon- α correspond à l'IFN fusionné à l'albumine. Cette nouvelle forme est aussi efficace que le PEG-IFN- α mais avec seulement une dose toutes les deux à quatre semaines due à sa demi-vie plus longue (Nelson *et al.*, 2010; Zeuzem *et al.*, 2008). La Viramidine est une pro-drogue de la ribavirine qui est métabolisée de préférence au niveau du foie et possède la même activité anti-HCV, mais sans l'effet hémolytique (Marcellin *et al.*, 2010). L'IFN- λ a été testé récemment dans le traitement de l'hépatite C. La forme pégylée de cet IFN s'est révélée intéressante pour traiter les patients chroniquement infectés par le HCV de génotype 1, avec ou sans la ribavirine (Muir *et al.*, 2010).

Actuellement, plusieurs nouvelles molécules ciblant spécifiquement le virus sont en phase clinique de développement (Table 1). Ces molécules anti-HCV sont appelées STAT-C. Leur développement est basé sur l'avancement de la biologie moléculaire, fonctionnelle et structurale des protéines du HCV. Trois protéines virales sont ciblées : la protéase NS3, la polymérase virale NS5B et la protéine NS5A (Sakamoto & Watanabe, 2009). L'activité protéasique de NS3 (avec son cofacteur NS4A, voir I.B.4.5) est nécessaire à la libération des différentes protéines virales qui participent à la formation des complexes de réplication. De nombreuses molécules anti-NS3 sont en voie de développement notamment le Telaprevir (ou VX-950) et le Boceprevir (SCH 503034), qui sont actuellement en phase clinique 3 (McHutchison *et al.*, 2010; Sakamoto & Watanabe, 2009). Tous les deux interagissent directement avec le site actif de NS3 bloquant son activité protéasique. Il existe également d'autres anti-NS3, mais qui ne ciblent pas son site actif. La protéine NS5B est une ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp) qui est essentielle à la réplication virale (voir I.B.4.8). Les inhibiteurs de NS5B sont divisés en deux types majeurs : les inhibiteurs nucléosidiques (NIs) qui bloquent le site actif de l'enzyme, et les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNIs), appelés aussi allostériques qui inhibent l'activité enzymatique en se fixant à distance du site

actif. Après le retrait de NM283 et R1626 pour leurs effets secondaires et l'acquisition rapide d'une résistance à ces composés, R7128 est l'inhibiteur du groupe NIs le plus avancé (phase clinique 2) (Sarrazin & Zeuzem, 2010). Plusieurs molécules du groupe NNIs (telles que BI207127 et Filibuvir) sont actuellement en phase clinique 2 de développement. La protéine NS5A constitue également une cible pour les molécules anti-HCV en raison de son rôle essentiel dans la réplication virale et dans la production des virus infectieux. Le BMS-790052 inhibe la réplication virale en interagissant avec la protéine NS5A (Gao *et al.*, 2010). Pour éviter l'émergence de génomes viraux résistants, les molécules STAT-C doivent être utilisées en combinaison entre elles ou avec l'IFN.

Les facteurs cellulaires impliqués dans le cycle viral du HCV présentent également une approche prometteuse pour le développement de nouveaux traitements anti-HCV en vue de minimiser le risque de résistance. Toutefois, les molécules ciblant des protéines cellulaires peuvent être toxiques (Khattab, 2009). Récemment, il a été montré que la cyclophiline A est impliquée dans la réplication du HCV (Kaul *et al.*, 2009). Le Debio-025, un inhibiteur spécifique des cyclophilines et ne possédant pas d'activité immunosuppressive, s'est révélé avoir une activité anti-HCV intéressante. Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase 2 (Flisiak *et al.*, 2009). Le Nitazoxanide est un antiparasitaire dont l'action anti-HCV se caractérise par l'activation de la PKR, un effecteur de l'action antivirale de l'interféron. Il est actuellement en essai clinique de phase 2 (Rossignol *et al.*, 2008).

Molécule	Companie	Phase d'essai clinique					Cible	Mode d' action
		Pré	I	II	III	IV		
Telaprevir	Vertex	■	■	■	■	■	Inhibiteurs de la protéase NS3/4A	
Boceprevir	Schering-Plough / Merck							
TMC435350	Tibotec / Medavir							
R7227	InterMune / Roche							
MK-7009	Merck							
BI201335	Boehringer Ingelheim							
Narlaprevir	Schering-Plough / Merck							
BMS-650032	Bristol-Myers Squibb							
PHX1766	Phenomix							
R7128	Roche / Pharmasset	■	■	■	■	NS5B	Inhibiteurs Nucléosidiques (NIs)	
PSI-7851	Pharmasset							
IDX184	Idenix							
BI207127	Boehringer Ingelheim							
MK-3281	Merck							
Filibuvir	Pfizer							
VCH759	ViroChem Pharma							
VCH916	ViroChem Pharma							
VCH222	ViroChem Pharma							
ANA598	Anadys							
GS-9190	Gilead							
ABI-333	Abbott							
BMS-790052	Bristol-Myers Squibb						Inhibiteur de NS5A	
Silibinin	Rotapharm-Madaus						Inhibiteur de NS5B?	
Debio 025	Debiopharm	■	■	■	■	Cibles cellulaires	Inhibiteurs de Cyclophiline	
NIM811	Novartis							
SCY-635	Scynexis							
Nitazoxanide								

(D'après (Sarrazin & Zeuzem, 2010))

Tableau 1 : Nouveaux traitements STAT-C anti-HCV en essai clinique.

Les principales molécules STAT-C (pour : Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV) qui sont actuellement dans des phases différentes d'études cliniques ainsi que leurs caractéristiques sont présentées.

6.3. Perspective de vaccination

Actuellement, aucun vaccin contre le HCV n'est disponible. Cependant, plusieurs vaccins à des fins prophylactiques et thérapeutiques font actuellement l'objet d'essais cliniques (Gal-Tanamy *et al.*, 2009) (Table 2).

Les vaccins prophylactiques ont pour but d'induire une protection contre l'infection par le HCV. Choo et collaborateurs ont obtenu des résultats encourageants en injectant à des chimpanzés des hétérodimères de E1E2 purifiés. Une immunité, humorale et cellulaire, a été obtenue pour empêcher le développement d'une infection chronique chez les chimpanzés lorsque ceux-ci sont challengés avec le virus du même génotype (Choo *et al.*, 1994). Ce vaccin est actuellement en essai clinique phase 1. D'autres approches basées sur la vaccination par des vecteurs plasmidiques ou viraux exprimant des protéines virales du HCV ont été également utilisées (Abraham *et al.*, 2004; Folgori *et al.*, 2006; Pancholi *et al.*, 2003).

Les vaccins thérapeutiques sont utilisés pour améliorer les traitements actuels anti-HCV. En effet, des données suggèrent que l'efficacité du traitement IFN/ribavirine est liée étroitement à la réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire (Baumert *et al.*, 2000; Caetano *et al.*, 2008; Cramp *et al.*, 2000). Il est donc possible de renforcer la réponse immunitaire par un vaccin approprié pour améliorer la réponse aux thérapies standards et contrôler l'apparition des mutants d'échappement.

Type	Objectif clinique	Immunogène	Companie	Phase d'essai clinique	Efficacité
Protéines recombinantes	Prévention	E1/E2 (adjuvant; huile/eau)	Chiron / Novartis	I	Réponse immunitaire humorale et cellulaire Protection de chimpanzés contre l'infection chronique par des virus proches
	Thérapeutique	Protéine C avec adjuvant ISCOMATRIX	Chiron / Novartis & CSL	I	Réponse de type cellules-T chez les macaques
		NS3-NS4-NS5-C avec adjuvant SCOMATRIX	Chiron / Novartis & CSL	I	Réponse de type cellules-T chez les chimpanzés
Peptides synthétiques	Thérapeutique	Peptides de C, NS3 et NS4 avec adjuvant poly-arginine (IC41)	Intercell	II	Réponse de types cellules-T chez les patients infectés mais sans diminution significative de charge virale, sauf en cas de charge virale initiale élevée
		Peptides de HCV formulés avec des virosomes du virus d'influenza	Pevion Biotech	I	Réponse de type cellules-T chez les souris
		Cocktail de peptides dérivés de E1, E2, NS3, NS5A	Kurume University	I	Induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire chez les patients infectés
ADN	Thérapeutique	Vaccin à ADN codant NS3/NS4A (Chron-Vac-C)	Tripep & Inovio	I	Induit un effet transitoire sur la charge virale chez les patients infectés
Vecteurs Recombinants	Prévention	MVA exprimant NS3, NS4 et NS5B (TG 4040)	Transgene	I	Diminution de la charge virale chez certains patients
	Thérapeutique	Levures tuées par la chaleur exprimant les protéines C et NS3 (GI-505, Tarmogen)	Globe-Immune	II	Réponse de type cellules-T chez les souris

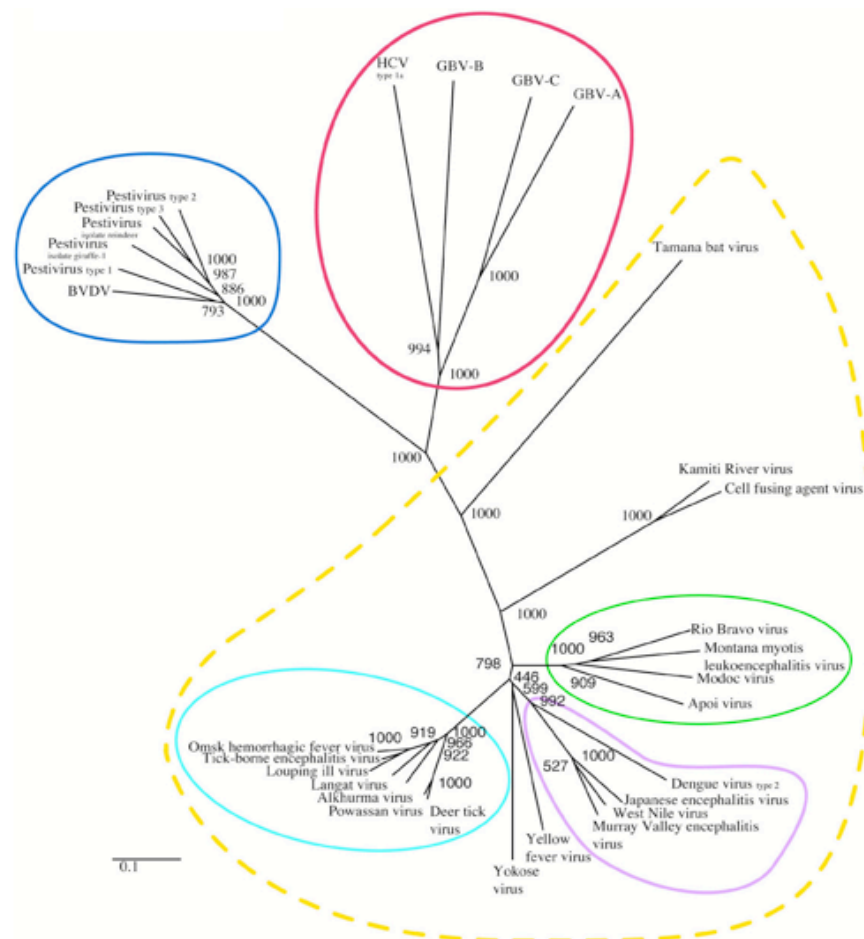
(D'après (Gal-Tanamy *et al.*, 2009))

Tableau 2 : Les principaux vaccins thérapeutiques et prophylactiques anti-HCV qui sont actuellement en étude clinique

B. Le virus de l'hépatite C

1. Classification et variabilité génomique

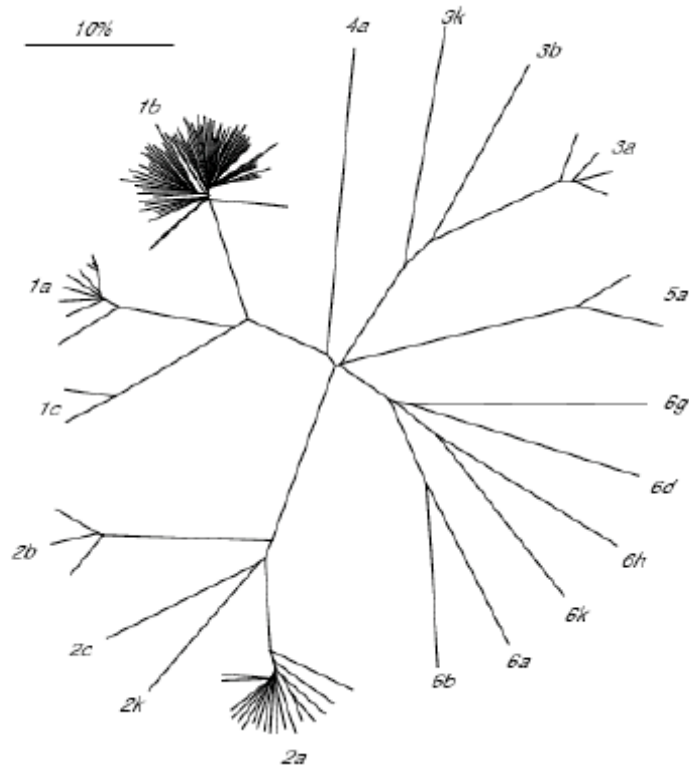
Les études sur la séquence et l'organisation génétique du génome du HCV ont montré qu'il possède des similitudes avec les membres de la famille des *Flaviviridae* (Choo *et al.*, 1991). Initialement constituée de deux genres: les *Flavivirus* et les *Pestivirus*, cette famille regroupe également aujourd'hui le genre *Hepacivirus* dont le HCV qui représente un de ses membres (Figure 4) (Robertson *et al.*, 1998). Ce genre contient en plus le virus GBV-B. Les deux autres virus GBV-A et GBV-C sont non classés, néanmoins ils sont proches des *Hepacivirus* (Lindenbach *et al.*, 2007).



(D'après (Ferron *et al.*, 2005))

Figure 4 : Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae*.

Les isolats du HCV provenant du monde entier présentent une variabilité génétique importante. Ainsi, au moins six principaux génotypes du HCV (génotype 1-6) ont été définis par l'analyse phylogénétique (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1993). Les génomes viraux diffèrent par leurs séquences nucléotidiques (31 à 33%). Chaque génotype est divisé en plusieurs sous-types identifiés par des lettres minuscules (a, b, c ...) qui diffèrent entre eux par 20 à 25% en séquence nucléotidique (Figure 5) (Kuiken & Simmonds, 2009; Robertson *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 2005).

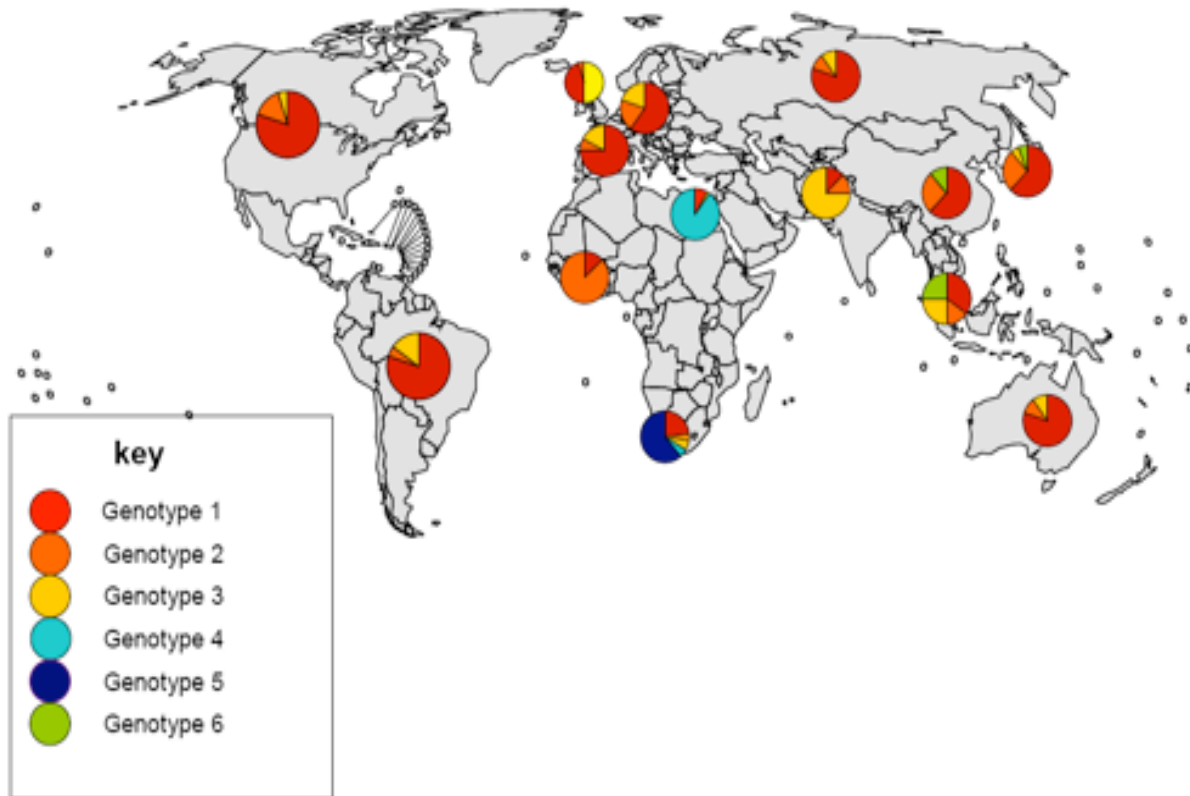


(D'après la base de données sur le HCV de Los Alamos)

Figure 5 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences codantes complètes des différents génotypes du HCV.

La répartition géographique des génotypes est inégale dans le monde. Les HCV de génotypes 1, 2 et 3 sont détectés sur tous les continents, mais avec des prévalences variables selon chaque région (Figure 6) (Dusheiko *et al.*, 1994; McOmish *et al.*, 1994). Le génotype 4 est majoritaire au Moyen-Orient, en Afrique du nord et dans certains pays méditerranéens, alors que le génotype 5 existe uniquement en Afrique du Sud. Le génotype 6 est observé principalement en Asie du sud-est (Davidson *et al.*, 1995; Dusheiko *et al.*, 1994; Mellor *et al.*, 1995). En France, le génotype 1, prédominant, infecte 57% (41% pour le 1b et 16% pour le

1a) des patients quant au génotype 3 il ne constitue que 22% des infections (Martinot-Peignoux *et al.*, 1999).



(D'après (W.H.O, 2009))

Figure 6 : Répartition des différents sous-types du HCV dans le monde.

La variabilité génétique du HCV est attribuée à l'absence de l'activité 3'-5' correctrice de son ARN polymérase (la protéine NS5B). Le taux d'erreur de cette polymérase est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} par nucléotide/site/an (Kato *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 1991; Stumpf & Pybus, 2002). Avec environ 10^{12} virions produits par jour (Neumann *et al.*, 1998), le virus peut accumuler des mutations dans son génome qui ne sont pas forcément déterminantes pour son infectiosité, mais qui peuvent avoir un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire (Gottwein & Bukh, 2008). Sur le plan clinique, déterminer le génotype se révèle d'une grande importance puisque les différents génotypes ne réagissent pas de la même manière au traitement IFN- α /ribavirine. Ainsi, celui-ci s'est révélé plus efficace sur les génotypes 2 et 3 que sur ceux des génotypes 1 et 4 (Feld & Hoofnagle, 2005; Manns *et al.*, 2006; Zein, 2000). Il est à remarquer que les patients infectés par le génotype 3 ont plus de risques de développer

une stéatose (Adinolfi *et al.*, 2001; Hourieux *et al.*, 2007b; Piodi *et al.*, 2008; Rubbia-Brandt *et al.*, 2004).

2. La particule virale

La nucléocapside, issue de l'assemblage de la protéine de capsidite et renfermant l'ARN viral, est enveloppée par une membrane lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2, le tout constituant la particule virale du HCV (Figure 7) (Kaito *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2005). Les études effectuées en microscopie électronique ont montré que les particules ont une forme sphérique avec un diamètre de 55 à 65 nm. Le noyau de ces particules, correspondant à la nucléocapside, a un diamètre de 33 à 43 nm (Ishida *et al.*, 2001; Kaito *et al.*, 1994; Maillard *et al.*, 2001). Les particules virales qui circulent dans le sang ont des densités et des formes hétérogènes (Kanto *et al.*, 1994; Thomssen *et al.*, 1993). Des analyses réalisées par ultracentrifugation ont révélé que la densité des particules virales varie de 1.03 à 1.25 g/ml ou plus, et qu'elle diffère également d'un sérum à l'autre (Hijikata *et al.*, 1993c; Pumeechockchai *et al.*, 2002; Trestard *et al.*, 1998). Cette variation est apparemment due à l'association de ces particules virales à des macromolécules, en particulier aux apolipoprotéines, B et E, qui correspondent aux lipoprotéines de très faible ou de faible densité (VLDL et LDL), et des immunoglobulines (Andre *et al.*, 2002; Hijikata *et al.*, 1993c; Nielsen *et al.*, 2006). Les particules virales produites en culture cellulaire ont une densité comprise entre 1.03 et 1.16 g/ml et un diamètre de 40 à 70 nm (Gastaminza *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2010; Wakita *et al.*, 2005). De plus, la densité des particules virales infectieuses est inférieure à 1.1 g/ml, suggérant que la particule virale est associée aux VLDLs (Chang *et al.*, 2007; Gastaminza *et al.*, 2006).

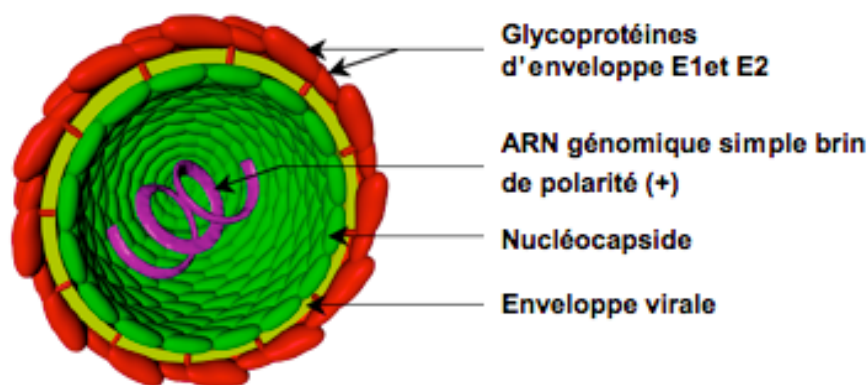


Figure 7 : Représentation schématique d'une particule du HCV.

3. Organisation du génome

Le génome du HCV est constitué d'un ARN simple brin linéaire de polarité positive d'environ 9.6 kb. Ce génome possède deux régions non-codantes très structurées appelées 5' et 3' NC qui flanquent un long cadre ouvert de lecture (ORF) codant une polyprotéine unique. Les protéines structurales se situent à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine, tandis que les non-structurales occupent la partie centrale et l'extrémité C-terminale (Figure 8).

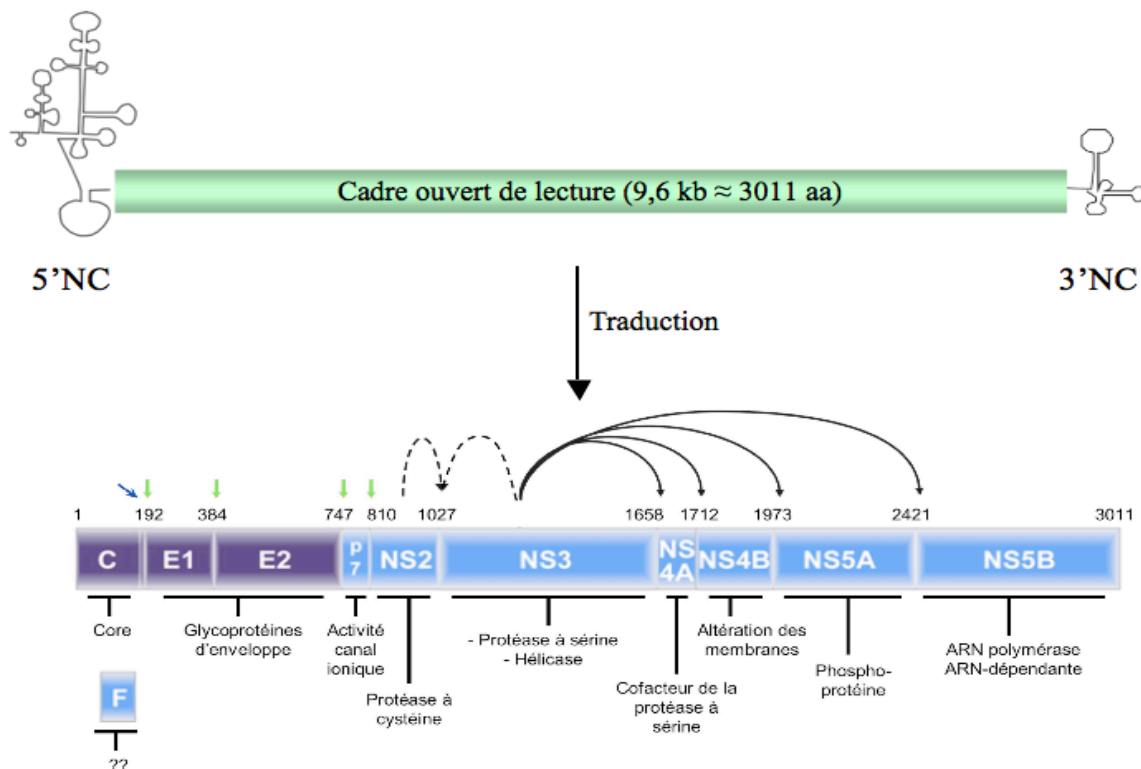


Figure 8 : Organisation génomique du HCV.

L'ARN génomique est constitué de deux régions non-codantes (5'NC et 3'NC) et un seul cadre ouvert de lecture à partir duquel le précurseur protéique est synthétisé. Les sites de clivage de la peptidase de signal peptide (SPP), des signal-peptidases cellulaires et des protéases virales (NS2/3 et NS3/4A) sont représentées par des flèches bleues, vertes et noires respectivement. L'auto-clivage entre les protéines NS2 et NS3 est représenté en pointillés. Les positions des sites de clivage correspondent à celles sur la souche H (génotype 1a ; numéro d'accèsion AF009606). Les protéines structurales sont en violet et les protéines non-structurales en bleu

3.1. La région 5' non-codante

La région 5' non-codante (5'NC) est une région hautement structurée et conservée parmi tous les génotypes. Elle se compose de quatre domaines numérotés de I à IV, contenant de nombreuses tiges-boucles, et un pseudonœud (voir Figure 26, I.C.6) (Honda *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1996a; Wang *et al.*, 1995). Des signaux nécessaires à la réplication virale ont été

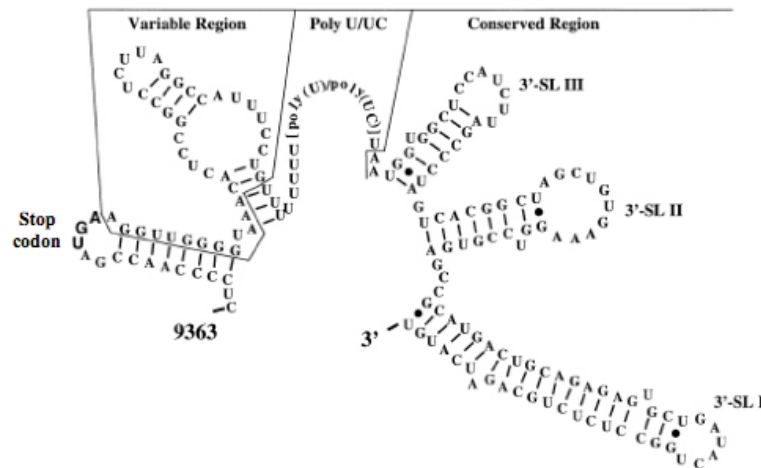
trouvés dans les domaines I et II, cependant, une réplication efficace de l'ARN viral nécessite l'intégralité de cette région (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). La région 5'NC contient également un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) capable d'initier la traduction de l'ARN viral après son association aux ribosomes (Brown *et al.*, 1992; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). L'IRES du HCV est composé des domaines II à IV et du début de la séquence codant la protéine de capsid (Honda *et al.*, 1996a; Reynolds *et al.*, 1995).

3.2. Le cadre ouvert de lecture

Le génome du HCV est traduit en une unique polyprotéine d'environ 3011 acides aminés. Au cours de la synthèse protéique, la polyprotéine est processée par des protéases cellulaires puis par des protéinases virales pour donner, au moins, 10 protéines virales. Ces protéines sont divisées en : protéines structurales dans la partie N-terminale de la polyprotéine (protéine de capsid et glycoprotéines E1 et E2) et des protéines non-structurales (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (Figure 8 et Figure 10)(Grakoui *et al.*, 1993b; Hijikata *et al.*, 1991; Hijikata *et al.*, 1993b). Deux protéines supplémentaires ont été également décrites pour lesquelles l'expression est dépendante de la séquence codant la protéine de capsid. La première appelée « F » (ou ARFP) qui résulte d'un décalage ribosomique -2/+1 lors de la lecture de la séquence codante (Xu *et al.*, 2001). La deuxième protéine, appelée « minicore », est issue d'une initiation interne au niveau de l'AUG du codon 91 de la protéine de capsid (Eng *et al.*, 2009).

3.3. La région 3' non-codante

La région 3' non-codante est une séquence de 200 à 235 nucléotides (nts). Elle est constituée d'une région variable de 40 nucléotides environ peu conservée entre les génotypes, suivie d'une séquence poly-U/C de longueur variable puis d'une séquence hautement conservée de 98 nucléotides dite « la région X » (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1996). Cette dernière possède une structure secondaire formée de 3 tiges-boucles (Figure 9) (Blight & Rice, 1997; Tanaka *et al.*, 1996). La région poly-U/C et la région X sont nécessaires à la réplication et à l'infectiosité, tandis que des délétions sont tolérées dans la région variable (Yanagi *et al.*, 1999; Yi & Lemon, 2003). La région 3'NC aurait également un rôle dans la traduction de l'ARN viral (Song *et al.*, 2006).

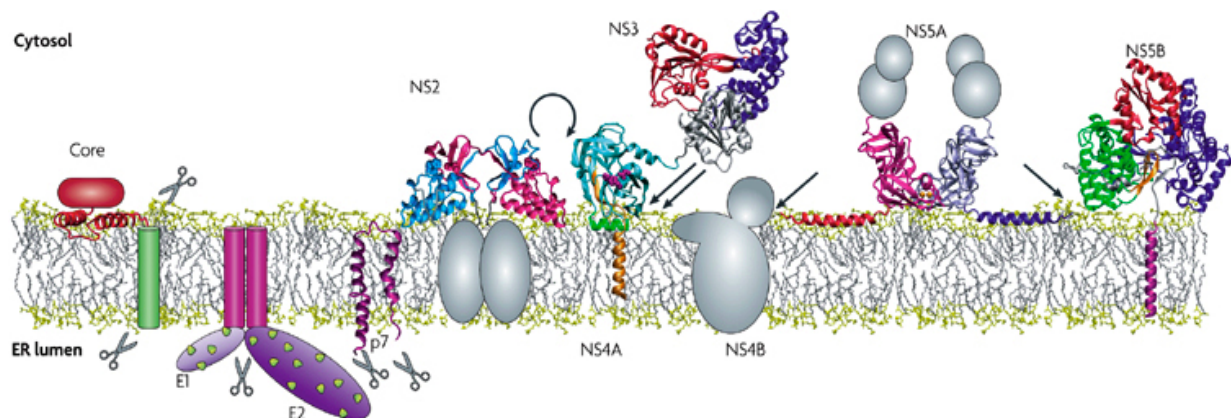


(D'après (Lemon *et al.*, 2007))

Figure 9 : Structure de la région 3'NC de l'ARN génomique du HCV

4. Les protéines virales

Les protéines du HCV sont classées en deux groupes, les protéines structurales (S) qui entrent dans la composition du virion et les protéines non structurales (NS) qui interviennent dans le cycle répliatif du virus. La maturation de la polyprotéine du HCV libère ces protéines au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Toutes les protéines sont ainsi intimement liées au RE (Figure 10). Certaines sont ancrées à sa membrane, alors que d'autres seulement apposées à sa surface



(D'après (Moradpour *et al.*, 2007))

Figure 10 : Structure et associations membranaires des protéines du HCV

Les ciseaux indiquent les zones de clivage par les signal peptidase (côté luminal) et peptidase de peptide signal (côté cytosolique) du RE. Les flèches indiquent l'action protéasique des protéases virales NS2/NS3 et NS3/NS4A. Les formes pleines représentent les topologies et/ou les structures encore inconnues des segments protéiques

4.1. La protéine de capside C

Un chapitre sur la protéine de capside du HCV sera développé ultérieurement (voir I.C.)

4.2. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Le génome du HCV code deux glycoprotéines qui sont ancrées dans la membrane du RE sous la forme d'un hétérodimère noncovalent (Deleersnyder *et al.*, 1997; Op De Beeck *et al.*, 2004). Elles représentent la clé par laquelle le virus parvient à se fixer sur ses nombreux récepteurs cellulaires pour entrer dans la cellule. La glycoprotéine E1 est composée de 192 acides aminés (aa 192 à 383 dans la séquence polypeptidique, ~33 à 35 kd), tandis que la glycoprotéine E2 est située entre les aa 384-746 (~ 70 kd) (Lindenbach *et al.*, 2007). Ces deux protéines sont N-glycosylées au niveau du motif Asn-X-Ser/Thr, où X est un acide aminé autre que la proline. La glycoprotéine E1 possède 4 à 5 sites potentiels de glycosylation (Figure 11) (Dubuisson *et al.*, 1994; Goffard & Dubuisson, 2003; Meunier *et al.*, 1999). Les analyses, effectuées en SDS-PAGE, ont montré que la glycosylation de E1 dépend de la présence de E2. De plus, l'inversion de l'ordre d'expression sur la polyprotéine de ces deux protéines (c.-à-d., E2 puis E1) perturbe la glycosylation de E1 (Dubuisson *et al.*, 2000). La protéine E2 possède 11 sites potentiels de N-glycosylation, tous localisés dans la partie N-terminale de la protéine. (Figure 11) L'ensemble des sites de glycosylation, dans E1 ou E2, est très conservé (Goffard & Dubuisson, 2003; Zhang *et al.*, 2004b). Les sites N1 et N4 de E1 et N8 et N10 de E2 semblent nécessaires à l'hétérodimérisation de E1 et de E2 dans un complexe fonctionnel (Goffard *et al.*, 2005; Meunier *et al.*, 1999).

E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I, composé d'un ectodomaine N-terminal de ~160 et ~334 aa respectivement, et d'un domaine transmembranaire C-terminal (TMD) d'environ 30 aa (Figure 11). Les deux protéines sont associées au RE grâce à des signaux de rétention présents dans les domaines TMD, qui sont aussi nécessaires à la biogenèse et à la formation des hétérodimères E1E2 (Cocquerel *et al.*, 1999; Op De Beeck *et al.*, 2001; Op De Beeck *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que des résidus chargés, présents dans le TMD de E2, et une région de E2, proximale de la membrane, jouent un rôle dans la biogenèse, la formation et la fonctionnalité des hétérodimères E1E2 (Ciczora *et al.*, 2005; Drummer & Pountourios, 2004).

Des régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la glycoprotéine E2 (Figure 11). Les 27 premiers acides aminés de l'ectodomaine de E2 forment HVR1 (Kato *et al.*, 1992; Weiner *et al.*, 1991). Malgré la variabilité des aa de cette région, plus de 80% entre les géotypes, les propriétés physicochimiques et la conformation de HVR1 restent très conservées (Penin *et al.*, 2001). Cette variabilité est probablement due à la sélection des variants capables d'échapper à la réponse immunitaire, cependant, la région HVR1 constitue une des régions responsables de l'induction d'une réponse neutralisante identifiée pour le HCV (Farci *et al.*, 1996). Deux autres régions hypervariables appelées HVR2 (7-9 aa) et HVR3 (36 aa) ont été également décrites (Kato *et al.*, 1992; Troesch *et al.*, 2006).

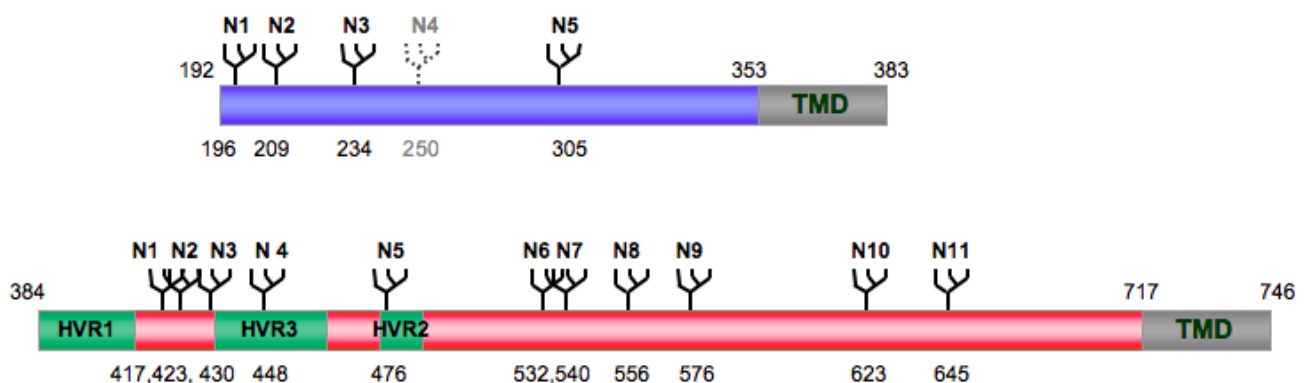


Figure 11 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2

Les positions des N-glycosylations sont indiquées par un N suivi d'un numéro correspondant à leur position relative dans chaque glycoprotéine. La numérotation des résidus indiquée sous la séquence correspond à celle de la souche virale de référence H. TMD, domaine transmembranaire ; HVR, région hypervariable.

Les glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont essentielles à l'entrée du virus dans la cellule hôte (Bartosch *et al.*, 2003b; Cormier *et al.*, 2004). Ce rôle est classiquement attribué à la protéine E2 puisque des anticorps anti-E2 sont capables de neutraliser le virus empêchant l'infection (Lindenbach *et al.*, 2005). Le rôle de E1 dans l'entrée virale est peu connu, cependant une étude récente a démontré que des anticorps dirigés contre E1 peuvent neutraliser à la fois les HCVpp et les HCVcc (Dreux *et al.*, 2006). Enfin, ces deux glycoprotéines participent à l'assemblage des particules virales infectieuses, puisqu'une délétion au niveau de E1 et E2 conduit à un virus non-viable (Wakita *et al.*, 2005).

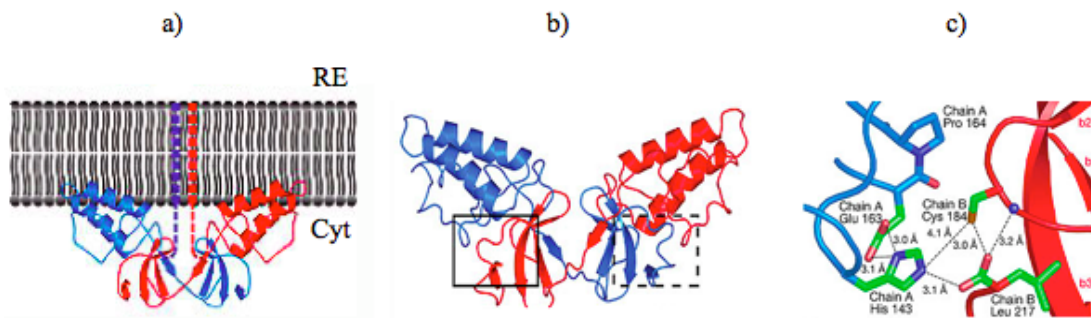
4.3. La protéine p7

P7 est une petite protéine de 63 aa (~7 kd) située à la jonction entre les protéines structurales et non-structurales. Elle est libérée au cours de sa synthèse par une signal peptidase qui agit entre E2 et p7 et p7 et NS2 (Lin *et al.*, 1994). La p7 est une protéine hydrophobe composée de deux TMD séparés par un petit segment basique de 3 aa, avec les extrémités N- et C-terminales orientées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer *et al.*, 2002). La protéine p7 se localise au niveau du RE et/ou aux membranes mitochondriales (Carrere-Kremer *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005), néanmoins en condition de surexpression une partie est également détectée à la surface de la cellule. *In vitro*, plusieurs travaux ont montré que la p7 est capable de moduler la perméabilité des membranes cellulaires suggérant qu'elle exerce une activité de canal ionique (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003). Cette activité semble nécessiter sa multimérisation en hexa- ou heptamère (Clarke *et al.*, 2006; Luik *et al.*, 2009). La protéine p7 n'est pas nécessaire à la réplication virale, cependant, des expériences, chez le chimpanzé, ont montré que cette protéine est essentielle pour l'infection virale (Sakai *et al.*, 2003). Son rôle dans la viabilité du virus a été confirmé par des expériences en culture cellulaire avec le système HCVcc. La p7 s'est révélée être nécessaire à l'assemblage et à la sécrétion des particules virales infectieuses mais elle n'interviendrait pas dans l'entrée virale (Brohm *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). Son importance au cours du cycle viral du HCV fait de cette protéine une cible potentielle pour des molécules thérapeutiques (Griffin *et al.*, 2008).

4.4. La protéine NS2

NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kd, dotée d'une activité protéasique (Grakoui *et al.*, 1993a; Hijikata *et al.*, 1993a; Santolini *et al.*, 1995). La protéine NS2 est libérée de la protéine P7 par une signal peptidase, tandis que le clivage entre NS2 et NS3 est généré par l'activité protéasique de NS2 (Grakoui *et al.*, 1993a). Lorsqu'elle est exprimée seule, la protéine NS2 est associée aux membranes du RE (Franck *et al.*, 2005). Sa topologie membranaire n'est pas clairement définie. Cependant, la présence de séquences peptidiques hydrophobes internes laisse penser que la protéine NS2 est organisée en plusieurs domaines transmembranaires (Pietschmann *et al.*, 2006; Yamaga & Ou, 2002). La protéine NS2 est une protéase à cystéine dont l'activité est portée par la protéine NS2 et une partie N-terminale de la protéine NS3 (le domaine de l'activité protéase de NS3, 180 aa) et des ions de Zn^{2+}

(Grakoui *et al.*, 1993a; Pallaoro *et al.*, 2001; Pieroni *et al.*, 1997). L'étude structurale de NS2 a révélé qu'elle est un dimère comprenant deux sites actifs. Pour chaque site, les résidus catalytiques sont fournis par les extrémités C-terminales des deux monomères (Figure 12) (Lorenz *et al.*, 2006).



(D'après (Lorenz *et al.*, 2006))

Figure 12 : Structure 3D de la protéine NS2

a) Structure 3D du dimère de la protéine NS2 et sa position par rapport à la membrane du RE. **b)** Structure du domaine protéasique de NS2. Les deux sites actifs sont indiqués par deux carrés. **c)** Les résidus impliqués dans chaque site actif des deux monomères.

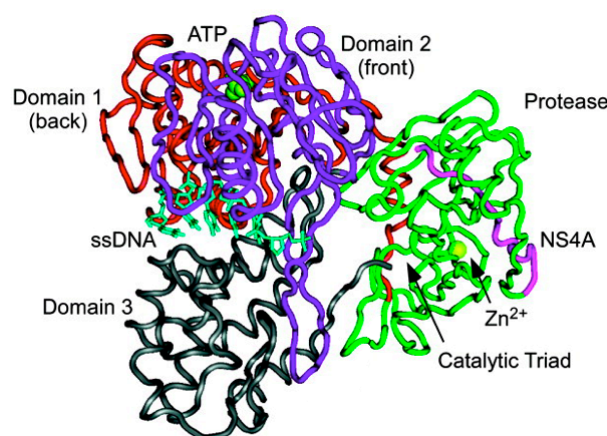
Bien que NS2 ne soit pas essentielle à la réplication virale, son clivage de NS3 est nécessaire à la libération des protéines du complexe de réplication (Kolykhalov *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999; Welbourn *et al.*, 2005). Plusieurs groupes ont étudié récemment l'implication de NS2 dans le cycle infectieux du HCV. Il a ainsi été montré que NS2 et son domaine d'activité protéasique, mais pas l'activité protéasique elle-même, sont nécessaires à l'infectiosité virale (Jirasko *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2007). Cette protéine semble jouer un rôle important dans l'assemblage des particules virales via une complexité d'interactions avec les protéines structurales et non-structurales du HCV (Phan *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). Il est important de noter que NS2 peut interagir avec la protéine pro-apoptotique CIDE-B. Elle peut donc inhiber l'apoptose induite par CIDE-B (Erdtmann *et al.*, 2003) et moduler la transcription cellulaire (Dumoulin *et al.*, 2003) et la traduction virale dépendante de l'IRES (She *et al.*, 2008).

4.5. Les protéines NS3 et NS4A

La protéine NS3 (631 aa, ~ 69 kd) est une protéine bi-fonctionnelle dotée d'une activité sérine protéase localisée dans sa partie N-terminale et une activité RNA hélicase/NTPase dans la partie C-terminale.

Son activité protéasique est activée par son association avec la protéine NS4A, une protéine transmembranaire de 54 aa. Celle-ci sert de co-facteur pour NS3, pour cliver entre NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et finalement NS5A/NS5B (Bartenschlager *et al.*, 1993; Bartenschlager *et al.*, 1995; Failla *et al.*, 1994). Les données structurales montrent que la protéine NS4A permet de stabiliser et de structurer correctement la partie N-terminale de la protéine NS3, son domaine protéasique, via des liaisons hydrogènes entre la partie centrale de NS4A et la région N-terminale de NS3. Cette interaction conduit à des changements de conformation et au repositionnement du site actif (Kim *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995). De plus, ce domaine contient un site de fixation d'un ion Zn^{2+} , essentiel pour la conformation du site catalytique mais pas pour l'activité protéasique elle-même (Figure 13) (Love *et al.*, 1996).

La protéine NS3, contrairement à la protéine NS4A, ne possède pas un domaine transmembranaire susceptible de lui permettre d'être ancrée dans la membrane du RE (Moradpour *et al.*, 2003). Lorsqu'elle est exprimée seule, elle est localisée de façon diffuse dans le cytosol et le noyau. Toutefois, son interaction avec NS4A lui permet d'être associée au RE, grâce au domaine hydrophobe de NS4A (Wolk *et al.*, 2000). De plus, l'association entre ces deux protéines protège NS3 contre une dégradation protéolytique (Tanji *et al.*, 1995). La protéase NS3/NS4A est capable également de cliver des protéines cellulaires impliquées dans l'immunité antivirale innée. En effet, elle clive les protéines Cardif et TRIF, des protéines adaptatrices de RIG-I et TLR-3, dans les voies de signalisation responsables de la reconnaissance des ARN double-brin, permettant au virus de contourner les défenses antivirales innées (Li *et al.*, 2005a; Meylan *et al.*, 2005).



(D'après (Frick *et al.*, 2004))

Figure 13 : Structure de la protéase NS3/NS4A

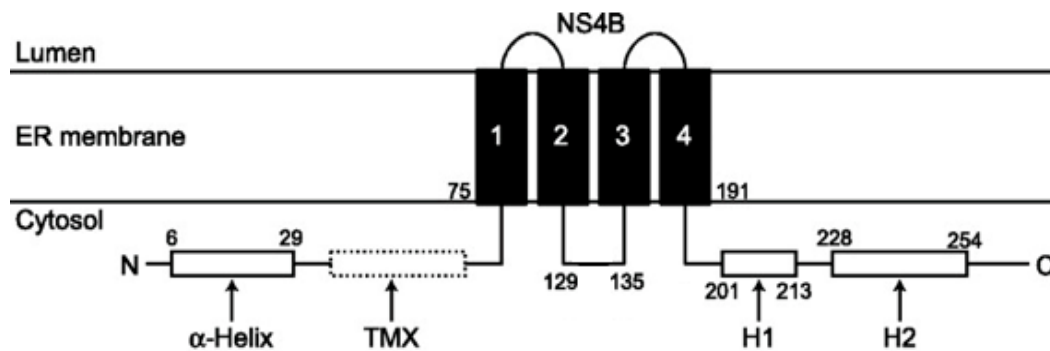
La partie C-terminale de la protéine NS3 possède une activité NTPase/hélicase capable de dérouler les duplexes ARN-ARN sous la dépendance de l'ATP. Elle est aussi capable de le faire sur des duplexes ADN-ADN (Kim *et al.*, 1995; Tai *et al.*, 1996). Le domaine hélicase de la protéine NS3 du HCV présente la forme de la lettre « Y » avec 3 sous-domaines de taille équivalente (Figure 13) (Kim *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1997). Lors du déroulement des duplexes d'ARN, l'activité NTPase utilise préférentiellement l'ATP comme source d'énergie pour alimenter l'activité hélicase. De plus, les ions Mn^{2+} augmentent considérablement cette activité hélicase (Belon & Frick, 2009). Par ailleurs, l'activité hélicase peut être modulée par celle de la protéase, probablement par des interactions entre les deux domaines. En effet, le déroulement des duplexes d'ARN est plus rapide dans le contexte de la protéine complète et en présence du cofacteur NS4A. Par ailleurs, dans ce contexte, moins de molécules d'ATP sont hydrolysées suggérant que le domaine protéase permet une utilisation plus efficace de l'ATP (Frick *et al.*, 2004; Kuang *et al.*, 2004). L'activité hélicase pourrait servir à : 1) séparer les duplexes d'ARN viral pour faciliter le travail de la polymérase virale lors de la réplication, 2) éliminer les structures secondaires de l'ARN viral pour favoriser la traduction/réplication virale, 3) ou dissocier les protéines de l'ARN pour faciliter la réplication/traduction virale (pour revues (Dubuisson, 2007; Frick, 2007).

La protéine NS3 et ses activités enzymatiques sont nécessaires à la réplication du génome viral *in vitro* et *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000; Lam & Frick, 2006). Des travaux menés récemment ont démontré également l'importance de la protéine NS3 dans l'assemblage des particules virales, indiquant son implication dans la morphogénèse et l'infectiosité du virus (Han *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme par lequel cette protéine agit dans l'assemblage n'est pas clairement identifié. L'importance de NS3/NS4A dans le cycle viral du HCV fait de cette protéine une cible prometteuse pour des nouvelles molécules antivirales (De Francesco & Migliaccio, 2005; Raney *et al.*, 2010).

4.6. La protéine NS4B

La protéine NS4B (~ 27-kDa) est une protéine hydrophobe associée aux membranes du RE (Hugle *et al.*, 2001) via une hélice α amphipathique localisée à son extrémité N-terminale et ses quatre TMD. D'autres hélices α ont été également identifiées à l'extrémité N-terminale (Elazar *et al.*, 2004; Gouttenoire *et al.*, 2009). La NS4B est orientée vers le cytoplasme (Figure 14) (Lundin *et al.*, 2003).

L'expression de la protéine NS4B seule ou dans le contexte de la polyprotéine induit la formation de structures membranaires spécifiques, appelées réseau membranaire (*membranous web*). Elles sont associées aux complexes de réplication et servent de plateformes d'amplification de l'ARN viral (Egger *et al.*, 2002). La modification post-traductionnelle, comme la palmitoylation intervenant sur les cystéines, favoriserait la formation des complexes de réplication en facilitant la polymérisation de NS4B impliquée dans la formation des structures membranaires (Yu *et al.*, 2006). La NS4B possède également une activité GTPase et ATPase à son extrémité N-terminale, nécessaire à la réplication virale (Einav *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2009). D'autre part, il a été montré que des mutations à l'extrémité C-terminale de cette protéine affectent la réplication virale (Aligo *et al.*, 2009).



(D'après (Jones *et al.*, 2009))

Figure 14 : Topologie de la protéine NS4B par rapport à la membrane du RE

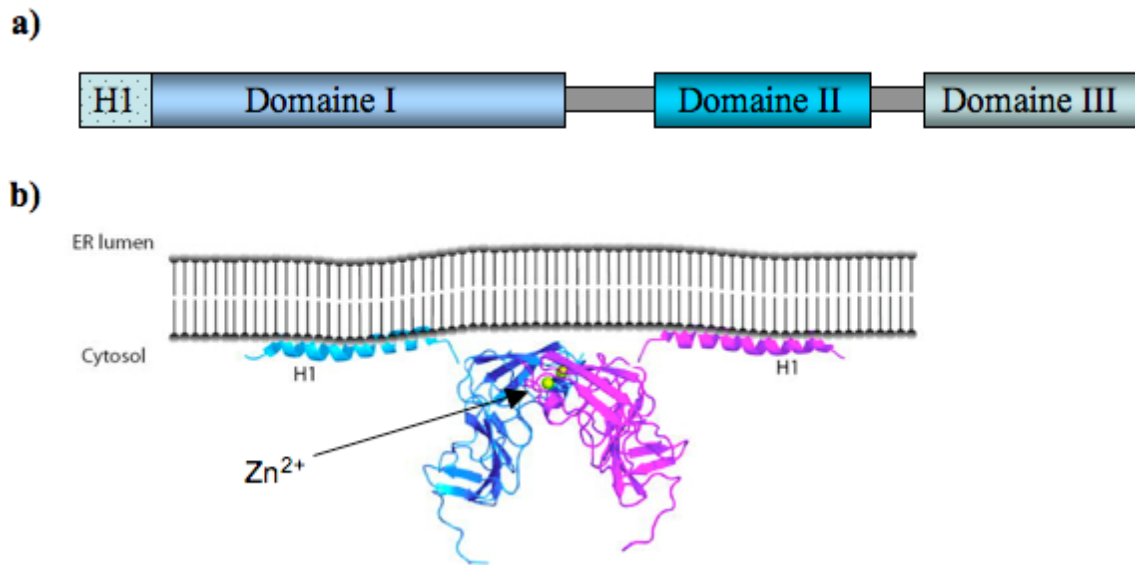
La protéine NS4B interagit aussi avec d'autres protéines du complexe de réplication, telles que les protéines NS3 et NS5A, et module l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Koch & Bartenschlager, 1999). Cette protéine est aussi capable d'influencer la production de virus infectieux (Jones *et al.*, 2009).

4.7. La protéine NS5A

La NS5A est une phosphoprotéine présente sous deux formes : phosphorylée (56 kDa) et hyperphosphorylée (58 kDa). Les 30 premiers aa de son extrémité N-terminale forment une hélice α amphipathique très conservée. Le côté hydrophobe de cette hélice permet à la protéine d'être associée aux membranes du RE et aux gouttelettes lipidiques (GLs) (Brass *et al.*, 2002; Elazar *et al.*, 2003). La NS5A est également une métalloprotéine à zinc composée de 3 domaines, I, II et III séparés par des séquences de faible complexité (Figure 15a).

(Tellinghuisen *et al.*, 2004). La structure cristallographique du domaine I de NS5A montre l'existence de deux sous-domaines. Le sous-domaine IA, en aval de l'hélice amphipathique et riche en aa basiques, contient quatre cystéines hautement conservées qui fixent un ion zinc essentiel à la structure de NS5A. Le sous-domaine IB, riche en aa acides, forme des homodimères par contacts entre les extrémités N-terminales du sous-domaine IA créant ainsi une gouttière basique orientée vers le cytosol (Figure 15b). Cette gouttière pourrait lier l'ARN viral présent dans le complexe de réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2004; Tellinghuisen *et al.*, 2005). En effet, il a été démontré que la protéine NS5A interagit avec l'extrémité 3' de l'ARN positif et négatif du HCV, et de préférence avec la région polypyrimidique (Huang *et al.*, 2005). Cette interaction permettrait à l'ARN d'être transporté vers les différents compartiments nécessaires à la traduction, à la réplication et à l'assemblage. De plus, la séquestration de l'ARN par la NS5A permettrait de le protéger de la dégradation par les nucléases cellulaires (Appel *et al.*, 2006). Les domaines II et III semblent moins impliqués dans la réplication virale. Toutefois, une étude récente a montré que certains aa du domaine II sont essentiels à la réplication alors que le domaine III l'est moins (Tellinghuisen *et al.*, 2008b). De plus, le domaine III tolère de grandes insertions sans affecter la réplication du HCV (Appel *et al.*, 2005; Moradpour *et al.*, 2004b). L'état de phosphorylation de la protéine NS5A influencerait également la réplication virale. Ainsi, des mutations ou des traitements avec des inhibiteurs de kinases cellulaires, qui réduisent l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A, augmentent considérablement la réplication du génome du HCV, indiquant une corrélation inverse entre l'hyperphosphorylation et la réplication (Appel *et al.*, 2005; Neddermann *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'hyperphosphorylation de NS5A bloque son interaction avec la protéine hVAP-A, une protéine nécessaire à la réplication virale (Evans *et al.*, 2004).

Des travaux récents ont souligné l'importance de la phosphorylation de certaines serines situées à l'extrémité C-terminale de NS5A pour la production des particules virales infectieuses, indiquant l'implication du domaine III dans la morphogénèse du HCV (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008a).



(D'après (Tellinghuisen *et al.*, 2005))

Figure 15 : La protéine NS5A

a) Représentation schématique des différents domaines de la protéine NS5A. b) Structure du dimère de NS5A comprenant son domaine I et l'hélice amphipathique (H1). Sa position par rapport à la membrane du réticulum endoplasmique est indiquée. Le domaine de chaque monomère est représenté par une couleur différente, bleu et violet. L'ion zinc est en jaune.

En dehors de son rôle dans la réplication et la production des particules virales infectieuses, la protéine NS5A agit sur plusieurs voies de signalisation cellulaire. En effet, dans les macrophages, la NS5A peut interagir avec la protéine MyD88, une molécule adaptatrice dans le système TLR, diminuant la production des cytokines induites en réponse aux ligands de TLR (Abe *et al.*, 2007). Elle est capable également d'interagir et de réprimer la PKR dépendant des ARN bicaténaires, un effecteur de l'action antivirale de l'interféron (Gale *et al.*, 1997; Pflugheber *et al.*, 2002). Ces activités sont importantes pour contourner la réponse immunitaire innée. Par ailleurs, *in vivo*, la NS5A porte atteinte à la réponse immunitaire innée et adaptative en inhibant l'induction de l'interféron β , de la 2'-5' oligoadénylate synthétase, la PKR et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Kriegs *et al.*, 2009). La protéine NS5A serait également capable d'inhiber, de manière dose-dépendante, la traduction dépendante de l'IRES virale, par contre elle n'affecte pas celle coiffe-dépendante (Kalliampakou *et al.*, 2005). Finalement, la protéine NS5A est également liée à l'accumulation des lipides dans les cellules hépatiques via l'activation de l'expression de PPAR- λ (peroxisome proliferators-activated receptors) impliqué dans l'homéostasie des lipides (Kim *et al.*, 2009).

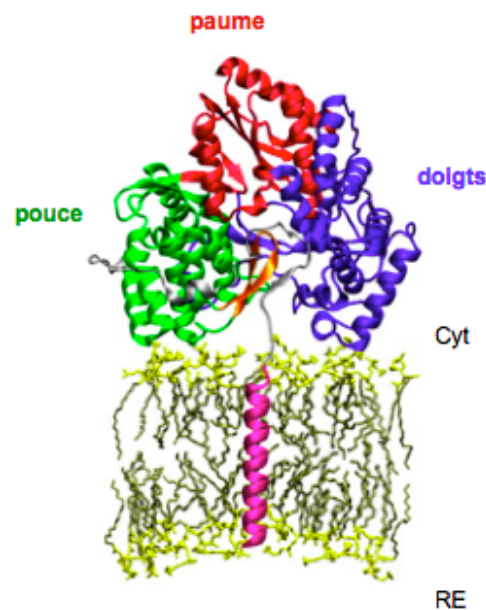
4.8. La protéine NS5B

La protéine NS5B (~ 68 kDa) est l'ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp) du HCV et elle est indispensable à la réplication virale (Behrens *et al.*, 1996). Comme la majorité des protéines du HCV, elle est associée au RE ou aux membranes dérivées du RE *via* les 21 aa de son extrémité C-terminale qui forment une hélice α transmembranaire (Ivashkina *et al.*, 2002; Schmidt-Mende *et al.*, 2001). L'ancrage de NS5B à la membrane du RE est nécessaire à la réplication du génome du HCV en culture cellulaire (Moradpour *et al.*, 2004a). La NS5B exerce son activité polymérasique par un motif Gly-Asp-Asp (GDD), très conservé chez la famille RdRp (Lohmann *et al.*, 1997).

La structure cristallographique de la NS5B révèle un repliement en « main droite » comparable aux autres polymérases avec trois sous-domaines : les « doigts », le « pouce » et la « paume » (Figure 16) (Bressanelli *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999). Une des caractéristiques de la NS5B du HCV est que son site actif est complètement encerclé. Cette structure est due aux interactions multiples entre les doigts et le pouce, créant ainsi un tunnel pour mener l'ARN simple brin vers le site actif de l'enzyme, situé dans la paume. Les NTPs utilisés pour l'élongation de l'ARN en cours de synthèse atteignent le site actif par un autre tunnel chargé positivement. L'activité enzymatique de NS5B utilise spécifiquement des ions Mg²⁺ (Bressanelli *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999).

La NS5B interagit spécifiquement avec une tige boucle, appelée 5BSL3.2, située dans sa séquence codante. Cette liaison permettrait le recrutement de l'enzyme à l'extrémité 3' du brin d'ARN positif *via* des interactions ARN-ARN entre la structure 5BSL3.2 et la boucle SL2 dans l'extrémité 3'NC (Friebe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). L'activité polymérase de NS5B semble être modulée par des interactions avec d'autres protéines virales. En effet, *in vitro*, la protéine NS5A inhibe l'activité de NS5B de manière dose-dépendante (Shirota *et al.*, 2002), par contre cette interaction semble essentielle pour la réplication du réplicon en culture cellulaire (Shimakami *et al.*, 2004). D'autre part, la protéine de capsid est aussi capable d'interagir avec la NS5B diminuant ainsi la réplication virale (Kang *et al.*, 2009; Uchida *et al.*, 2002). D'autres protéines cellulaires ont été également décrites comme des protéines modulatrices de l'activité de NS5B. Notamment, plusieurs travaux suggèrent que les cyclophilines interagissent avec la protéine NS5B, mais des désaccords existent sur l'identité de la cyclophiline impliquée. Ainsi certains résultats indiquent que la cyclophiline B est capable d'interagir avec NS5B et favoriser son interaction avec l'ARN viral et la synthèse du génome viral (Heck *et al.*, 2009; Watashi *et al.*, 2005). D'autres travaux ont souligné

l'implication de la cyclophiline A, et non la cyclophiline B, dans des interactions avec NS5B et NS5A, privilégiant ainsi un rôle pour cette cyclophiline dans la réplication virale (Chatterji *et al.*, 2010; Kaul *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b). La protéine kinase (PRK2) s'est révélée également nécessaire à la phosphorylation de NS5B qui augmente à son tour la réplication virale (Kim *et al.*, 2004b). Finalement, la protéine NS5B interagit avec la nucléoline, une phosphoprotéine nucléolaire, favorisant ainsi la réplication du HCV (Hirano *et al.*, 2003; Shimakami *et al.*, 2006).



(D'après ((Appel *et al.*, 2006))

Figure 16 : Structure 3D de la protéine NS5B

La structure représente la protéine NS5B complète et sa position par rapport à la membrane du RE. Le site catalytique est cytosolique et il est composé de trois domaines (doigts, paume et pouce). L'hélice transmembranaire nécessaire à l'ancrage dans la membrane de RE est en magenta.

5. Modèles d'études

5.1. Les modèles animaux

Le chimpanzé est le seul animal qui puisse être infecté par le virus de l'hépatite C. Bien avant que le génome viral soit isolé, cet animal a été utilisé pour étudier des cas d'hépatites post-transfusionnelles, appelées à l'époque hépatite Non-A, Non-B. Des études ont été menées sur des chimpanzés auxquels des serums de patients avaient été inoculés (Alter *et al.*, 1978; Hollinger *et al.*, 1978). Par la suite, il a été utilisé pour reproduire une infection

virale et valider l'ADNc infectieux en inoculant le génome viral, préparé *in vitro*, directement dans le foie de l'animal (Kolykhalov *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 1997). L'animal infecté par le virus présente une évolution de l'infection similaire à ce qu'on l'observe chez les humains. Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés sur le chimpanzé pour étudier i) l'infectiosité (Kolykhalov *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2003), ii) la progression de la maladie et la réponse immunitaire innée et adaptative (Bukh *et al.*, 2010; Major *et al.*, 2004; Manigold *et al.*, 2006; Thimme *et al.*, 2002) iii) la vaccination et de nouvelles molécules antivirales (Carroll *et al.*, 2009; Forns *et al.*, 2000; Puig *et al.*, 2004). Cependant, la réponse immunitaire et la sévérité de la maladie sont moins importantes que chez l'homme. L'utilisation du chimpanzé reste limitée pour des raisons éthiques mais aussi de coût de son entretien (Koike *et al.*, 2010). D'autres modèles animaux plus abordables ont été utilisés pour étudier le HCV, notamment des souris humanisées au niveau du foie. Dans ce cas, le foie d'une souris immunodéprimée (SCID) est détruit par la surexpression d'un transgène activateur d'urokinase plasminogène (Alb-uPA) dont l'expression est sous la dépendance du promoteur de l'albumine spécifique du foie, ce modèle est désigné uPA/SCID (Heckel *et al.*, 1990). L'animal est ensuite greffé par des cellules hépatiques humaines qui colonisent le foie détruit. Les souris obtenues peuvent être infectées par des sérums provenant de patients infectés par le HCV, ce qui peut conduire à une infection de longue durée (Mercer *et al.*, 2001). Ce modèle est notamment utile pour évaluer des molécules anti-HCV ou l'activité neutralisante des anticorps (Kneteman *et al.*, 2006; Meuleman *et al.*, 2008; Vanwolleghem *et al.*, 2008). Toutefois, il est inutilisable pour étudier la réponse immunitaire et les vaccins du fait que les souris sont immunodéprimées. De plus, les difficultés techniques limitent sa mise en place et le coût élevé restreint son utilisation. Des essais prometteurs ont été réalisés pour adapter le virus aux cellules de souris, ce qui permettrait, par la suite, d'utiliser la souris comme modèle d'étude plus complet (Bitzegeio *et al.*, 2010; Ploss *et al.*, 2009).

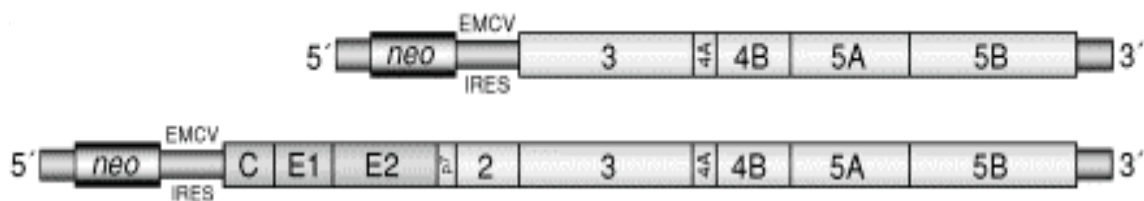
5.2. Les modèles cellulaires

❖ *Les réplicons*

Le développement des réplicons du HCV représente une étape majeure qui a permis l'étude de la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire. Par définition, le réplicon constitue une unité de réplication. Deux types de réplicons ont été construits, ce sont les réplicons sous-génomiques et génomiques. Ils peuvent être monocistroniques ou

bicistroniques et tous les deux possèdent un marqueur de sélection. Ils sont capables de se répliquer dans les cellules Huh-7, ou par fois dans d'autres cellules, sous la pression d'une sélection, exercée la plupart du temps, par l'antibiotique G418 conférant ainsi aux cellules une résistance à la néomycine.

Pour le réplicon sous-génomique, la séquence codant les protéines non-structurales (de NS3 à NS5B) est conservée alors que celle codant les protéines structurales a été remplacée par une séquence codant un marqueur de sélection. La séquence codant ce dernier est placée sous le contrôle de l'IRES du HCV tandis que celle codant les protéines nonstructurales du HCV est placée sous le contrôle d'un IRES hétérologue, celui du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Figure 17) (Lohmann *et al.*, 1999). Dans le réplicon génomique, le marqueur de sélection et l'IRES hétérologue sont insérés entre l'IRES du HCV et la séquence codant la protéine de capsid (Figure 17) (Ikeda *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2002).



(D'après (Bartenschlager *et al.*, 2004))

Figure 17 : Représentation schématique des réplicons du HCV

Les réplicons sont constitués d'une séquence codant un marqueur de sélection (*neo* = *neomycin phosphotransferase*) placée sous le contrôle de l'IRES du HCV et d'une séquence codant les protéines du HCV placée sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV, le tout encadré par des régions 5' et 3' NC du HCV. Les réplicons sous-génomiques (en haut) portent la séquence codant les protéines NS3 à NS5B du HCV tandis que les réplicons génomiques (en bas) portent la séquence entière de la polyprotéine.

Les réplicons ont permis i) la sélection de mutations d'adaptation qui augmentent considérablement la répllication du génome viral (Blight *et al.*, 2000; Krieger *et al.*, 2001), ii) l'étude et la visualisation des complexes de répllication (Moradpour *et al.*, 2004b), iii) l'étude et la découverte de nouvelles molécules anti-HCV (Huang *et al.*, 2008), iv) et la sélection de lignées cellulaires plus permissives à la répllication virale (et à la production des particules virales infectieuses par la suite) (Blight *et al.*, 2002).

❖ Les pseudo-virions du HCV et les virosomes

En l'absence initialement d'un modèle efficace permettant d'étudier le HCV, différentes approches ont été utilisées pour mimer le virus de l'hépatite C et ainsi produire du matériel ressemblant aux particules du HCV. Un de ces systèmes, appelé VLP (pour : virus like-particles), est constitué par des baculovirus recombinants exprimant dans des cellules d'insectes l'ensemble des protéines structurales du HCV (Baumert *et al.*, 1998). Malgré une faible infectiosité, ces particules ont permis d'étudier la fonction et la structure des protéines structurales, leur assemblage et l'encapsidation de l'ARN du HCV (Choi *et al.*, 2004; Clayton *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Des virus pseudotypés du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), exprimant des glycoprotéines recombinantes du HCV, ont été notamment utilisés pour étudier la fonctionnalité de l'hétérodimère E1E2 (Lagging *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2001). Mais, ces deux protéines étaient dépourvues des domaines TMD, or ceux-ci jouent un rôle important dans la conformation et la fonctionnalité des hétérodimères E1E2 (Ciczora *et al.*, 2005).

D'autres travaux ont rapporté l'utilisation d'un réplicon du virus de la forêt de Semliki (SFV) exprimant les protéines structurales du HCV dans des cellules mammaliennes (Blanchard *et al.*, 2002). Ce système permet d'étudier les interactions entre le RE et les protéines structurales et les étapes précoces de l'assemblage et du bourgeonnement. Cependant, il ne permet pas de produire des particules VLP infectieuses (Blanchard *et al.*, 2002). Une autre approche pour étudier la phase précoce de l'entrée virale était l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 dans des vésicules lipidiques de type liposomes (Lambot *et al.*, 2002). Ces virosomes sont difficiles à préparer et par conséquent leur utilisation est limitée.

❖ Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines E1 et E2 du HCV

Les systèmes développés auparavant pour étudier l'entrée virale n'étaient pas assez infectieux ou les glycoprotéines E1 et E2 qui les constituaient n'étaient pas dans un état mature (protéines délétées ou recombinantes). Pour surmonter ces difficultés, plusieurs équipes ont développé des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du HCV et appelées HCVpp. Ce sont des particules virales constituées par la capsid d'un rétrovirus (MLV ou HIV) entourée par une enveloppe portant les glycoprotéines E1 et E2 du HCV (Figure 18). La capsid contient un ARN porteur d'un gène rapporteur

codant la protéine GFP ou la luciférase (Bartosch *et al.*, 2003b; Drummer *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003).

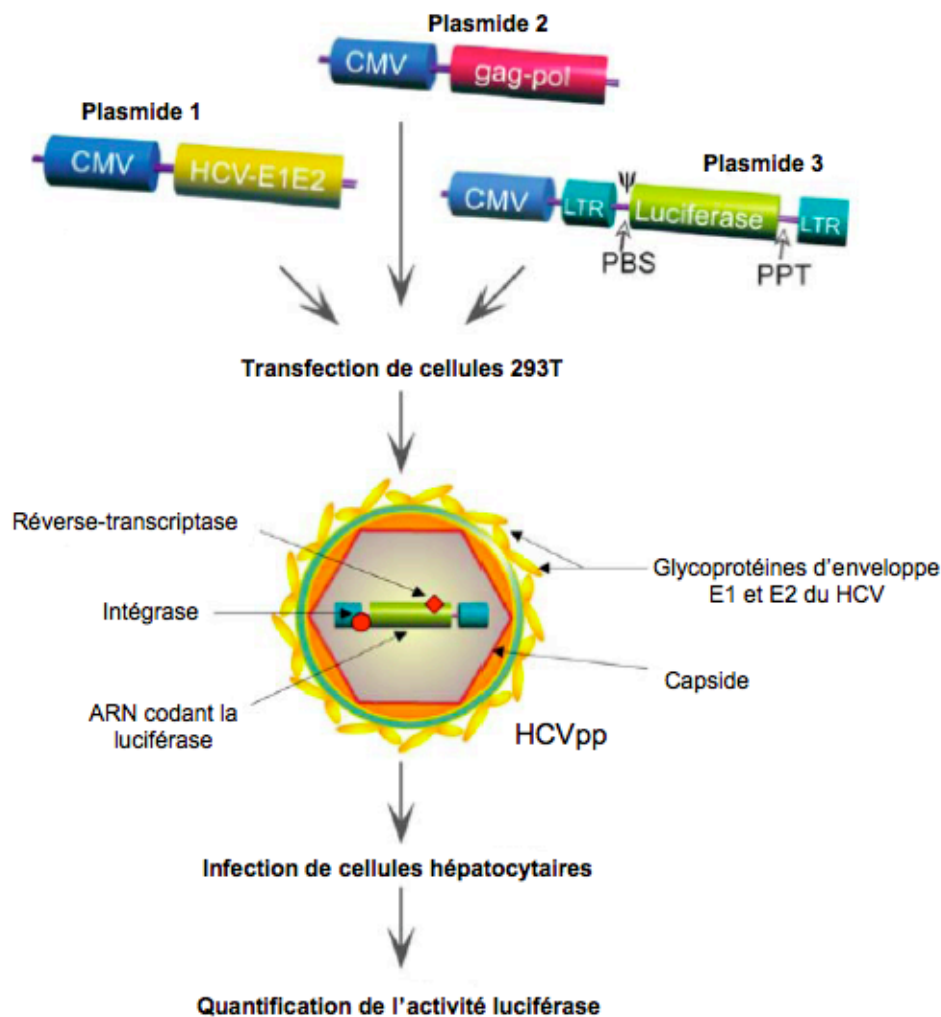


Figure 18 : Représentation schématique de la production des HCVpp.

Les cellules HEK-293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV. Le second exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du MLV ou du VIH (Matrice, Capside, Nucléocapside, Protéase, Réverse-transcriptase et Intégrase). Le troisième exprime un génome rétroviral contenant un gène rapporteur codant la luciférase. Le génome rétroviral contient les séquences nécessaires à la réverse transcription et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, PBS, PPT). Les protéines de matrice, capside et nucléocapside permettent son encapsidation (grâce au signal d'encapsidation Ψ), l'assemblage de la particule et son bourgeonnement à la membrane plasmique. Les particules rétrovirales HCVpp, portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2, sont sécrétées dans le surnageant de culture. Elles sont utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires. Les cellules infectées intègrent le gène rapporteur dans leur ADN génomique grâce à la reverse-transcriptase et à l'intégrase. L'expression de la luciférase permet de quantifier l'infectiosité des HCVpp.

Leur préparation nécessite la transfection des cellules humaines HEK-293T avec trois vecteurs d'expression : le premier exprime les glycoprotéines E1 et E2 du HCV, le deuxième exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du rétrovirus (MLV ou HIV) et le troisième code un ARN rétroviral porteur du gène rapporteur qui sera encapsidé (Figure 18). Les HCVpp sont sécrétées dans le milieu de culture cellulaire et la transduction aux cellules du gène rapporteur est dépendante des protéines d'enveloppe présentes à la surface des particules. Ainsi après infection, l'ARN est libéré dans les cellules et son expression permet de quantifier l'infectiosité des pseudo-particules virales (Bartosch *et al.*, 2003b; Drummer *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Il a été ainsi montré que les HCVpp présentaient un tropisme préférentiel pour les cellules d'hépatocytes (Bartosch *et al.*, 2003b).

Les HCVpp ont été utilisées pour étudier les différentes étapes de l'entrée virale (attachement, fixation, fusion et endocytose) et pour caractériser les récepteurs potentiels du HCV et le mécanisme d'entrée virale (Bartosch *et al.*, 2003c; Blanchard *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004a). Elles ont été utilisées également pour étudier et évaluer la réponse immunitaire et la neutralisation par les anticorps (Lavillette *et al.*, 2005a; Meunier *et al.*, 2005). Cependant, les HCVpp ne reflètent pas complètement le virus de l'hépatite C. En effet, elles ne suivent pas les mêmes voies d'assemblage et de sécrétion utilisées par le HCV et qui sont étroitement liées à celles des VLDL (Huang *et al.*, 2007; Sandrin *et al.*, 2005). De plus, le fait que ces particules ne possèdent pas un génome répliatif limite leur utilité à l'étude de l'entrée virale.

❖ *Les particules virales complètes produites en culture cellulaire (HCVcc)*

Depuis la découverte du génome du HCV en 1989, la plus grande avancée fut la mise en place, en 2005, d'un génome infectieux permettant la propagation du virus en culture cellulaire. L'histoire de ce système commence par le clonage réalisé sur un isolat du HCV de génotype 2a (JFH-1) provenant d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (Kato *et al.*, 2001). Les premières expériences ont montré que des réplicons sous-génomiques, dérivés de cet isolat, étaient capables de se répliquer efficacement en cellules Huh-7 sans avoir recours à des mutations d'adaptation (Kato *et al.*, 2003). Lorsque la totalité de la séquence de cet isolat a été transcrite et que l'ARN a été introduit dans les cellules Huh-7, il se révéla que le surnageant de celles-ci contenait des particules virales infectieuses capables d'infecter à nouveau des cellules Huh-7 naïves (Figure 19). Ainsi il fut possible de produire du virus natif, appelé HCVcc, pour HCV produit en culture cellulaire (Wakita *et al.*, 2005). Au même moment, d'autres groupes ont montré que l'ARN de cet isolat et celui d'un génome

chimérique, obtenu entre la souche J6 et JFH-1 du HCV de génotype 2a, étaient capables de reproduire un cycle viral complet en culture cellulaire (Lindenbach *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005), mais également d'établir une infection chronique sur des animaux. De plus, le HCVcc est neutralisable par des anticorps dirigés contre les protéines E2 et CD81 et par des sérums des patients chroniquement infectés (Lindenbach *et al.*, 2006; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Les particules virales ont des propriétés biophysiques similaires à celles isolées des patients ou du chimpanzé (voir I.B.2). Elles ont une densité variable avec un pic d'infectiosité spécifique compris entre les densités 1.09 et 1.1 g/ml. L'analyse par microscopie électronique a montré que ces particules sont sphériques et qu'elles ont un diamètre d'environ 50 à 65 nm (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Elles sont souvent associées à des lipoprotéines qui modulent leur densité, leur sécrétion et leur infectiosité (Chang *et al.*, 2007; Gastaminza *et al.*, 2006). D'autres essais pour produire des particules virales infectieuses appartenant aux autres génotypes du HCV ont été décrits. Mais ces virus sont peu ou pas infectieux par rapport au JFH-1 (Kato *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2006).

Les inconvénients de ces systèmes sont d'une part la faible production de particules virales, et de l'autre part, le fait que le virus qui est généré se limite principalement au génotype 2. Pour surmonter cette limitation et donner la possibilité d'étudier les autres génotypes du HCV, des virus chimériques inter- et intragénotypiques ont été construits. Le premier virus chimérique, construit par Lindenbach et collaborateurs, était constitué de la région codant les protéines de C à NS2 de la souche J6, fusionnée à la région codant les protéines non-structurales de JFH-1. Les deux souches sont de génotype 2a (Lindenbach *et al.*, 2005). Cette chimère produit un titre viral plus important que celui produit par le virus JFH-1. Depuis, de nombreuses chimères ont été élaborées en utilisant la région C à NS2 appartenant à d'autres génotypes (Gottwein *et al.*, 2007; Gottwein *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2008; Pietschmann *et al.*, 2006; Scheel *et al.*, 2008). Ces virus chimériques ont permis d'étudier les déterminants de l'entrée virale, les fonctions et l'implication des protéines non-structurales dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales de plusieurs génotypes. D'autre part ces chimères ont permis de trouver de nouvelles molécules antivirales et d'étudier la neutralisation par des sérums de patients infectés par le HCV (Gottwein *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2008; Scheel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

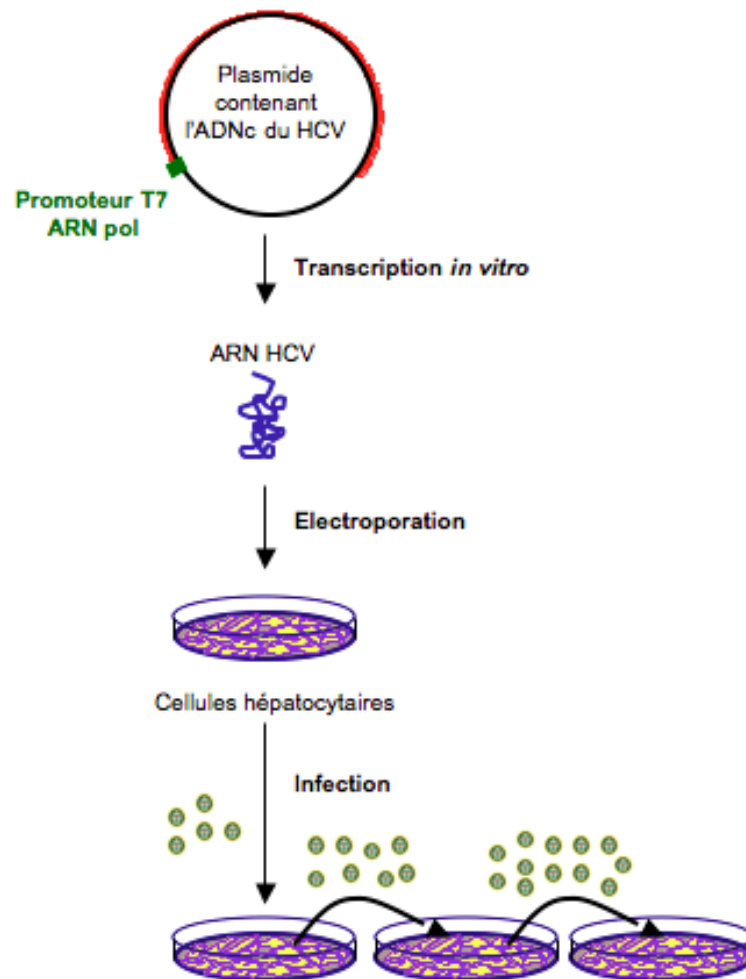


Figure 19 : Représentation schématique de la production de HCVcc

L'ARN viral est transcrit à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) du génome viral puis utilisé pour électroporer des cellules hépatocytaires naïves. Les cellules transfectées produisent des particules HCVcc qui sont utilisées pour infecter de nouvelles cellules hépatocytaires. Cette infection permet l'étude du cycle viral complet puisque les cellules infectées produisent de nouvelles particules virales. La réalisation d'infections successives permet d'amplifier le stock viral.

Initialement, le titre viral produit par la souche JFH-1 était assez faible. Plusieurs méthodes ont alors été utilisées pour en accroître le titre infectieux. L'une d'entre-elles a été de produire constitutivement le virus en intégrant l'ADNc infectieux du HCV dans le génome cellulaire de Huh-7 (Cai *et al.*, 2005). D'autres groupes ont remarqué qu'il est possible d'augmenter le titre infectieux en réalisant des infections successives sur des cellules naïves en se servant du surnageant des cellules transfectées puis infectées (Delgrange *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2005). Cette technique a permis de sélectionner des mutations d'adaptation localisées dans les protéines virales structurales et non-structurales. La ré-introduction de ces

modifications dans le génome viral a permis d'augmenter considérablement l'infectiosité du HCV (Bungyoku *et al.*, 2009; Delgrange *et al.*, 2007; Kaul *et al.*, 2007). D'autre part, des lignées cellulaires hautement permissives à la réplication du HCV ont été utilisées pour améliorer la production virale comme la lignée cellulaire Huh-7.5. Initialement, des cellules Huh-7 furent sélectionnées comme permissives au réplicon du HCV de génotype 1a. Celles-ci ont été ensuite traitées par l'IFN- α pour en éliminer le génome viral et les cellules issues de ce traitement ont constitué la lignée cellulaire Huh-7.5 (Blight *et al.*, 2002). Les titres viraux assez conséquents obtenus sur ces cellules sont dus à la présence d'une mutation dans la protéine RIG-I qui perturbe la voie de signalisation antivirale à laquelle elle participe (Sumpter *et al.*, 2005). De la même façon, la lignée Huh-7.5.1 a été obtenue par un traitement IFN- α sur des cellules Huh-7.5 (Zhong *et al.*, 2005). Ces cellules produisent, en effet, un titre viral plus élevé que la lignée d'origine.

D'autres modifications ont été également décrites pour faciliter la détection et la quantification de l'infection virale. Elles se basent sur l'insertion d'un gène rapporteur dans le génome du HCV. Certains auteurs ont construit des génomes bicistroniques dans lesquels le gène rapporteur est séparé des protéines virales par un IRES hétérologue qui sert à leurs expressions (Koutsoudakis *et al.*, 2006) ou alors des génomes monocistroniques dans lesquels les séquences codant le gène rapporteur sont insérées entre les protéines p7 et NS2 (Murray *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2009).

6. Cycle viral

Le virus de l'hépatite C infecte principalement le foie et les cellules hépatiques en particuliers. La compréhension actuelle du cycle viral du HCV repose essentiellement sur des analogies avec des virus de la même famille et sur les données obtenues avec les différents modèles (voir I.B.5) utilisés pour étudier les différentes étapes du cycle viral. Pour entrer dans la cellule hôte, le virus se sert de plusieurs facteurs d'attachement et d'entrée exprimés à la surface des cellules hépatiques. Après une internalisation par endocytose et une étape de décapsidation, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme des hépatocytes. Cet ARN génomique va servir de matrice pour la traduction des protéines virales et certaines d'entre-elles participeront à la réplication du génome du HCV. Les protéines structurales quant à elles s'assembleront avec l'ARN génomique pour former des nouveaux virions qui quitteront la cellule hôte en utilisant la voie de sécrétion cellulaire (Figure 20).

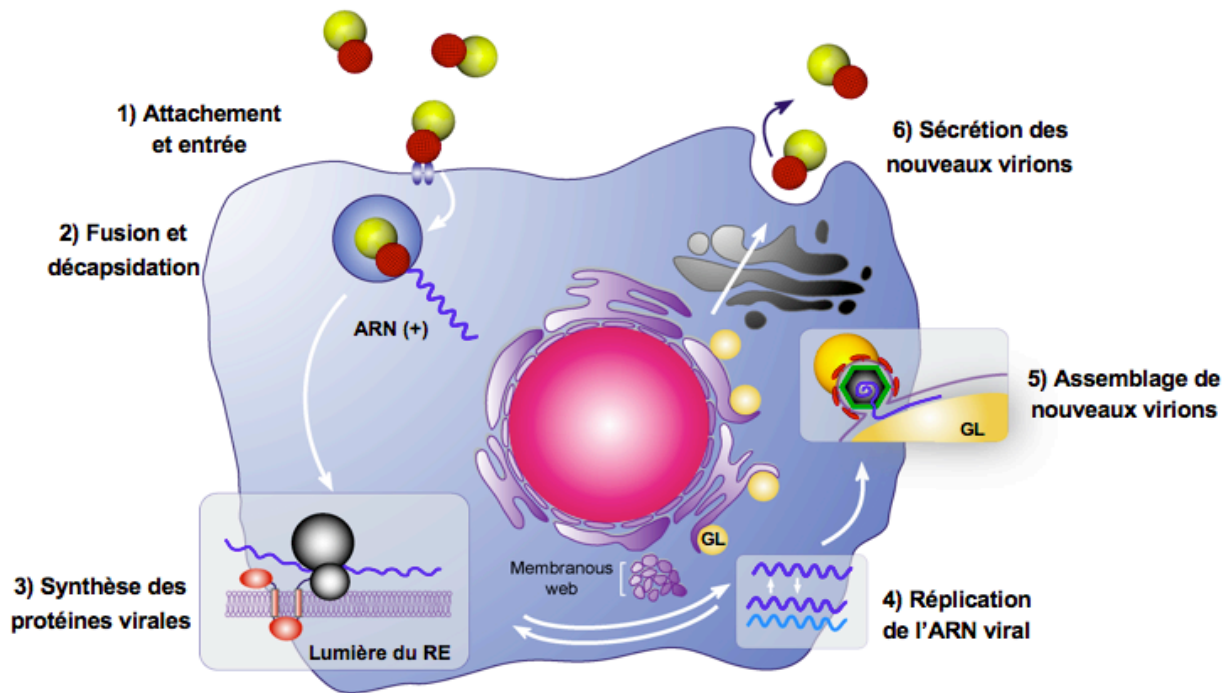


Figure 20 : Cycle viral putatif du HCV

Le virus se lie à la surface des cellules sur ses récepteurs spécifiques, il est ensuite internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (1). L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane endosomale, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme (2). Le génome sert à la synthèse des protéines virales dans le RE (3). Le génome viral est également utilisé pour la synthèse de brins négatifs qui serviront de matrice pour la production de nouveaux ARN génomiques de polarité positive (4). Les protéines structurales servent à l'assemblage de nouvelles particules virales. L'assemblage et l'encapsidation du génome viral sont associés aux gouttelettes lipidiques (GL) et aux membranes cellulaires (5). Les virions suivent enfin la voie de sécrétion jusqu'à leur export hors de la cellule (6).

6.1. L'attachement et l'entrée dans les hépatocytes

L'infection par le HCV débute par l'attachement du virus aux cellules cibles. Plusieurs facteurs d'attachement pour le HCV ont été décrits, tels que les glycosaminoglycanes (GAGs, notamment héparane sulfate) (Barth *et al.*, 2003; Koutsoudakis *et al.*, 2006) et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Agnello *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2007; Monazahian *et al.*, 1999; Wunschmann *et al.*, 2000). Les interactions du virus avec ces molécules sont relativement non-spécifiques ou se font avec des molécules associées à la surface des virions telles que les lipoprotéines.

Après l'attachement, des interactions entre les glycoprotéines d'enveloppe et des récepteurs spécifiques aident le virus à pénétrer dans la cellule hépatique. Quatre récepteurs sont décrits jusqu'au présent ; la tétraspanine CD81, le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI), la claudine I et l'occludine (Figure 21).

❖ Les récepteurs du HCV**➤ La protéine CD81**

La protéine CD81 a été initialement identifiée comme un facteur d'entrée par son interaction avec une forme soluble de la glycoprotéine E2 (Pileri *et al.*, 1998). Son rôle dans l'entrée virale a été ensuite confirmé par l'utilisation des HCVpp et HCVcc. En fait, des anticorps anti-CD81 et des formes solubles de la large boucle extracellulaire (LEL) de CD81 sont capables d'inhiber l'entrée des HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003c; Cormier *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004a) et HCVcc (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré *in vivo* que des anticorps anti-CD81 étaient capables de protéger des souris uPA-SCID greffées par des cellules hépatiques humaines (Meuleman *et al.*, 2008). La réduction de l'expression de CD81 grâce à des ARN interférents (siRNA) (Koutsoudakis *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004a) ou l'expression ectopique de CD81 dans des cellules non-permissives à l'infection, comme les HepG2 qui sont dépourvues de CD81, ont permis de confirmer le rôle majeur de ce récepteur dans l'entrée du HCV (Cormier *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004a). Koutsoudakis et collaborateurs ont montré que CD81 intervient à une étape postérieure de l'attachement des particules virales aux cellules via les glycosaminoglycanes (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

➤ La protéine SR-BI

Le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI) a été également identifié comme un facteur d'entrée du HCV en utilisant une forme soluble de la glycoprotéine E2 (Scarselli *et al.*, 2002). Les anticorps anti-SR-BI et la réduction de l'expression de SR-BI à l'aide d'ARN interférents inhibent l'infection des cellules par les HCVpp et les HCVcc, démontrant ainsi son rôle essentiel dans l'entrée du HCV (Bartosch *et al.*, 2003c; Grove *et al.*, 2007; Kapadia *et al.*, 2007; Lavillette *et al.*, 2005b; Zeisel *et al.*, 2007). De plus, l'expression ectopique du SR-BI rend des cellules d'hépatome de rat et des cellules épithéliales humaines sensibles à l'infection par les HCVpp (Dreux *et al.*, 2009). Les Lipoprotéines telles que HDL, LDL et VLDL constituent également des ligands pour SR-BI qui contrôle le transfert de leur contenu lipidique. La présence de HDL facilite l'entrée du HCV dans les hépatocytes par un mécanisme dépendant de SR-BI (Dreux *et al.*, 2006; Voisset *et al.*, 2005). Cependant, le rôle exact de ce récepteur dans l'entrée du HCV n'est pas complètement élucidé, mais il semble

qu'il constitue un récepteur important après l'attachement du HCV et avant que celui-ci n'interagisse avec CD81 (Figure 21) (Evans *et al.*, 2007; Zeisel *et al.*, 2007).

➤ Les protéines claudines (CLDN)

Le fait que la présence de SR-BI et de CD81, dans des lignées cellulaires différentes, ne suffise pas pour permettre une infection par des HCVpp a conduit à l'hypothèse que d'autres facteurs pourraient être requis pour l'entrée du HCV dans la cellule (Barth *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). En effet, l'expression d'une banque d'ADNc constituée à partir de cellules hépatiques humaines a permis d'identifier la protéine des jonctions serrées, claudine-1 (CLDN-1), comme un co-facteur nécessaire à l'entrée du HCV (Evans *et al.*, 2007). L'expression de cette protéine dans des cellules 293T, réfractaires à toute infection par le HCV bien que les protéines CD81 et SR-BI soient exprimées, les rend permissives aux HCVpp et HCVcc. De plus, la réduction de l'expression de la CLDN-1 dans les cellules Huh-7.5 bloque l'entrée virale (Evans *et al.*, 2007). Deux autres protéines, la claudine-6 et la claudine-9, ont été également décrites comme capables de rendre les cellules 293T permissives à l'infection par les HCVpp (Zheng *et al.*, 2007). Cependant, les CLDN-6 et -9 ne sont pas exprimées dans les lignées hépatocytaires permissives au HCV. Des travaux récents ont montré des interactions entre CLDN-1 et CD81, suggérant la formation d'un complexe de co-récepteurs entre les protéines (Harris *et al.*, 2008; Krieger *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008). En effet, après une interaction avec les glycoprotéines d'enveloppe, il semble que le complexe virus-CD81 subisse une migration latérale pour se concentrer au niveau des jonctions serrées avec la CLDN-1 (Brazzoli *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la protéine CLDN-1 joue un rôle tardif dans l'entrée virale (Figure 21). Cependant, d'autres études suggèrent que les jonctions serrées ne joueraient pas un rôle dans l'entrée virale (Mee *et al.*, 2009)

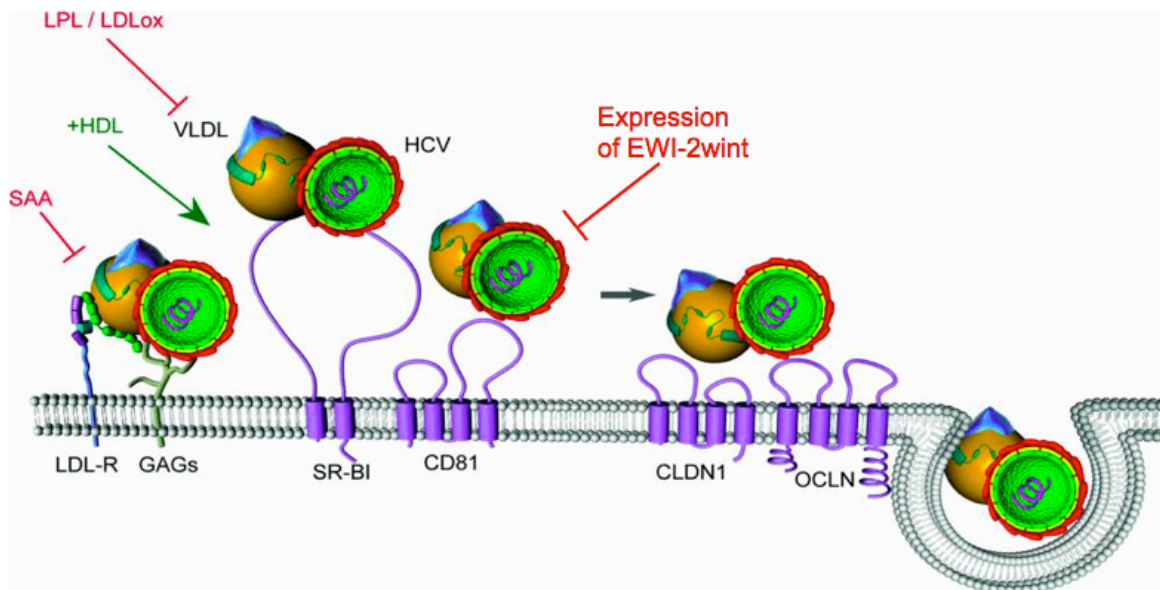
➤ La protéine Occludine (OCLN)

Une autre protéine des jonctions serrées, l'occludine (OCLN), a été identifiée comme le quatrième facteur nécessaire à l'entrée du HCV. En effet, l'utilisation d'ARNs interférents ciblant l'occludine inhibe l'infection du HCV (Liu *et al.*, 2009a). De plus, l'expression, dans des cellules murines, d'une banque d'ADNc a permis d'identifier l'occludine comme un nouveau facteur d'entrée des HCVpp (Ploss *et al.*, 2009). OCLN semble interagir avec la

protéine E2 de l'enveloppe virale (Liu *et al.*, 2009a). Comme pour CLDN-1, elle joue un rôle tardif dans l'entrée du HCV après une migration latérale du complexe virus-récepteur vers les jonctions serrées.

De ces quatre récepteurs, CD81 et OCLN semblent déterminer la spécificité d'espèce de l'entrée du HCV entre les cellules murines et humaines, puisque CLDN-1 et SR-BI murins fonctionnent comme leurs homologues humains (Ploss *et al.*, 2009).

Le tropisme spécifique du HCV pour les cellules du foie suggère l'existence d'autres facteurs qui modulent l'entrée virale. Dans une étude récente, il a été démontré que ce tropisme pourrait être expliqué par l'absence d'inhibiteurs de cette étape. En effet, l'expression ectopique de EWI-2wint, un partenaire de CD81, inhibe l'entrée du HCV en bloquant l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du virus et son récepteur CD81 (Figure 21) (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). Cette protéine inhibitrice n'est pas exprimée dans les hépatocytes. EWI-2wint est un produit de clivage de EWI-2 qui est un partenaire majeur de CD81 mais qui en l'état ne possède pas d'activité inhibitrice.



(D'après (Popescu & Dubuisson, 2009))

Figure 21 : Modèle d'entrée du HCV et sa modulation par certains facteurs cellulaires

Les glycosaminoglycanes (GAGs) et le LDL-R facilitent l'attachement initial du HCV sur les cellules cibles, par une interaction directe avec les glycoprotéines d'enveloppe ou par l'intermédiaire des lipoprotéines. Suite à cet attachement initial, la particule virale interagit avec différents récepteurs : les protéines SR-BI, CD81, claudine 1 (CLDN-1) et ocludine (OCLN). Différents facteurs modulent l'entrée du VHC : cette étape est facilitée par les HDL mais inhibée par la protéine EWI-2wint, l'apolipoprotéine serum amyloïde A (SAA), les LDL oxydées (LDLox) et la lipoprotéine lipase (LPL). La particule virale est internalisée par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine

❖ *L'internalisation et la fusion*

Après l'attachement et l'interaction du virus avec ses récepteurs, celui-ci pourrait être dirigé vers les jonctions serrées où il interagit avec CLDN-1 et OCLN qui vont faciliter son internalisation. Par analogie aux autres flavivirus, il a été démontré que l'entrée du HCV se déroule via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine suivie d'une fusion avec les endosomes précoces (Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006). Cette étape est dépendante du pH puisque l'entrée, des HCVpp et des HCVcc, peut être bloquée par des inhibiteurs de l'acidification des endosomes (Bartosch *et al.*, 2003c; Blanchard *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). Il est possible que l'acidification des endosomes déclenche un changement conformationnel des glycoprotéines E1 et E2 nécessaire à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale (Lavillette *et al.*, 2006; Op De Beeck *et al.*, 2004). Un test de fusion entre des HCVpp/HCVcc et des liposomes a montré que cette fusion est dépendante de la température et qu'elle ne nécessite pas la présence de récepteurs ou de protéines à la surface des liposomes. Cette fusion pourrait être facilitée par la présence du cholestérol, ou être affectée par des mutations dans les domaines transmembranaires de E1 et E2 (Ciczora *et al.*, 2007; Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006). Il a été montré qu'une région de E1 et deux régions de E2 sont impliqués dans cette étape (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2007). Une étude récente a suggéré que le réseau des microtubules est aussi impliqué dans l'entrée du HCV. Ces microtubules sont nécessaires pour acheminer le virus vers le site de fusion et également pour les événements après la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme (Roohvand *et al.*, 2009).

6.2. La synthèse des protéines virales

Après l'entrée du HCV dans la cellule et la libération de son génome, ce dernier est utilisé par la machinerie cellulaire pour être traduit directement. Cette étape est possible car le génome du HCV dispose d'un site d'entrée des ribosomes (IRES) situé dans sa partie 5'NC (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). La séquence IRES interagit avec les sous-unités 40S et 60s du ribosome et d'autres protéines cellulaires nécessaires à la formation du complexe d'initiation de la traduction 80S. La région 3'NC joue également un rôle régulateur dans la traduction du génome viral (McCaffrey *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2006).

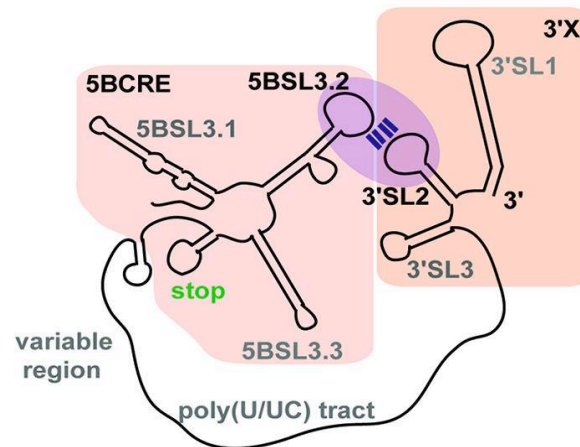
Une fois le complexe formé, la synthèse des protéines virales débute et la lecture du cadre unique génère les formes matures des protéines du HCV après des clivages co- et post-traductionnels médiés par des peptidases cellulaires et des protéases virales. Ainsi, les clivages entre les protéines de la capsid, les glycoprotéines E1 et E2, la protéine P7 et NS2 sont assurés par la signal peptidase et la peptidase de peptide signal (Hijikata *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1996; McLauchlan *et al.*, 2002). Les protéines non-structurales sont clivées par deux protéases virales, NS2 et NS3/NS4A (Figure 8 et Figure 10). La jonction NS2/NS3 est clivée en *cis* par l'activité protéasique à cystéine de NS2, tandis que l'activité sérine protéase de la protéine NS3, associée à la protéine NS4A, assure le clivage entre toutes les protéines non-structurales de NS3 à NS5B (Grakoui *et al.*, 1993a; Grakoui *et al.*, 1993b; Hijikata *et al.*, 1993a).

6.3. La réplication virale

Le HCV réplique son génome dans des complexes de réplication qui sont composés de l'ensemble des protéines virales non-structurales et qui jouent le rôle de plateformes d'amplification du génome viral. Comme pour d'autres virus à ARN positif, ces complexes de réplication sont en étroite association avec les membranes cellulaires. En effet, des altérations spécifiques au sein des membranes cellulaires appelées «membranous web» ont été identifiées comme les sites de réplication de l'ARN viral dans les cellules Huh-7 (Gosert *et al.*, 2003). Ces altérations sont formées par l'expression de la protéine NS4B indiquant son rôle essentiel dans la formation des complexes de réplication (Egger *et al.*, 2002).

Le mécanisme d'amplification du génome de HCV n'est pas encore complètement élucidé. La synthèse de l'ARN négatif nécessite néanmoins l'interaction entre deux séquences complémentaires localisées dans la région X de l'extrémité 3' de l'ARN et la structure secondaire 5BSL3.2 située dans la séquence codant la protéine NS5B (Figure 22). Cette interaction pourrait recruter la NS5B (l'ARN polymérase-ARN dépendant) à l'extrémité 3' du brin d'ARN positif pour synthétiser son brin complémentaire (Friebe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). L'extrémité 5' du génome contient également des structures secondaires nécessaires à la réplication virale (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; McMullan *et al.*, 2007). De plus, des travaux récents suggèrent que la réplication du HCV est favorisée par l'interaction, au niveau de deux sites localisés à l'extrémité 5'NC, d'un micro-RNA (miR-122) spécifiquement produit dans les hépatocytes humains (Jopling *et al.*, 2008; Jopling *et al.*, 2005). Les brins négatifs néosynthétisés serviront par la suite de matrices pour l'amplification du pool d'ARN

positifs. Ceux-ci seront alors soit encapsidés dans de nouvelles particules virales soit utilisés pour la synthèse des protéines virales.



(D'après (Tellinghuisen *et al.*, 2007))

Figure 22 : Représentation schématique de l'interaction entre la tige boucle 5BSL3.2 et la région 3'X-tail.

Le rôle des protéines virales impliquées dans la formation des complexes de réplication n'est pas encore parfaitement élucidé. La protéine NS4A est nécessaire à l'association de la protéine NS3 aux membranes du RE et elle favorise son activité hélicase, requise pour la réplication d'ARN viral (Kuang *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2002; Wolk *et al.*, 2000). La protéine NS4B est responsable de la formation des « membranous web », alors que la NS5B assure la fonction d'ARN polymérase (Behrens *et al.*, 1996; Egger *et al.*, 2002). La protéine NS5A est quant à elle capable de lier l'ARN viral et d'interagir avec NS5B pour moduler son activité enzymatique. Toutes ces interactions permettent à NS5A de moduler l'activité de NS5B et de faciliter et contrôler le transport de l'ARN viral entre les différents compartiments nécessaires à la traduction, à la réplication et à l'assemblage du HCV (Appel *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005; Shimakami *et al.*, 2004).

Des facteurs cellulaires associés aux complexes de réplication ou interagissant avec leurs composants peuvent également influencer la réplication de l'ARN viral. Ainsi plusieurs protéines cellulaires ont été décrites telles que :

- hVAP-A et hVAP-B (Evans *et al.*, 2004; Hamamoto *et al.*, 2005)
- cyclophilines (Chatterji *et al.*, 2010; Kaul *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b)
- protéine kinase 2 (PRK2) (Kim *et al.*, 2004b)
- FKBP8 et Hsp90 (Okamoto *et al.*, 2006; Ujino *et al.*, 2009)
- GBF-1 (Goueslain *et al.*, 2010)

Toutes ces protéines cellulaires se sont révélées importantes pour la réplication virale.

6.4. L'assemblage et la sécrétion virale

L'assemblage et la sécrétion des nouveaux virions sont les étapes finales du cycle infectieux du HCV. Celles-ci ont commencé à être clarifiées depuis la mise au point du système de production des particules virales infectieuses ou HCVcc. Étant donné que la protéine de capsid (C) est située dans la partie cytosolique du RE, l'assemblage du HCV débute probablement dans le cytosol par la formation d'une nucléocapside résultant de l'interaction entre la protéine C et l'ARN viral. Ces nucléocapsides sont ensuite enveloppées, par bourgeonnement, de membranes du RE dans lesquelles les glycoprotéines du HCV sont déjà ancrées. Les phases suivantes sont la maturation puis la libération des virions de la lumière du RE par exocytose (Figure 20 et Figure 23).

❖ *Les étapes précoces de l'assemblage*

Les étapes précoces de l'assemblage semblent nécessiter l'association de la protéine de capsid avec les gouttelettes lipidiques (GLs). La protéine C est libérée de la polyprotéine virale par deux clivages successifs, l'un nécessitant une signal peptidase et l'autre une peptidase de peptide signal avant d'être acheminée vers les GLs (Hussy *et al.*, 1996; McLauchlan *et al.*, 2002; Santolini *et al.*, 1994) dont leur importance a été suggérée pour la production de particules virales infectieuses. Ces organelles ont été proposées comme des sites préliminaires de l'assemblage viral (Figure 23). L'interruption de l'association protéine C/GL conduit à une diminution drastique ou à l'inhibition de la production virale (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007). L'ARN viral est répliqué dans des complexes de réplication situés au niveau du réseau membranaire, dans des structures liées et protégées par les membranes du RE (Gosert *et al.*, 2003; Moradpour *et al.*, 2003). Toutefois, la formation de la nucléocapside virale nécessite l'interaction entre la protéine C et l'ARN viral. Deux hypothèses ont été suggérées. Dans la première, les complexes de réplication pourraient être recrutés à proximité des GLs par deux interactions, la première se ferait entre le domaine I de la protéine NS5A et les GLs, alors que la seconde se ferait entre la protéine C et le domaine III de NS5A (Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007). La deuxième hypothèse se base sur le fait que les complexes de réplication sont transportés sur le réseau de microtubules grâce à des interactions entre les protéines NS5A et NS3 avec la tubuline et

l'actine (Lai *et al.*, 2008). Leur mobilité peut faciliter leur convergence avec la protéine C accumulée au niveau des GLs.

Les signaux et les séquences d'encapsidation au niveau de l'ARN viral et de la protéine de capsid n'ont pas été identifiés. Cependant, des études d'expression *in vitro* ont proposé une interaction entre la partie N-terminale de la protéine C, riche en aa basiques, et la région 5'NC de l'ARN du HCV (Fan *et al.*, 1999; Shimoike *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009). Ces résultats n'ont pas encore été confirmés avec le système HCVcc.

❖ *Rôle des protéines non-structurales*

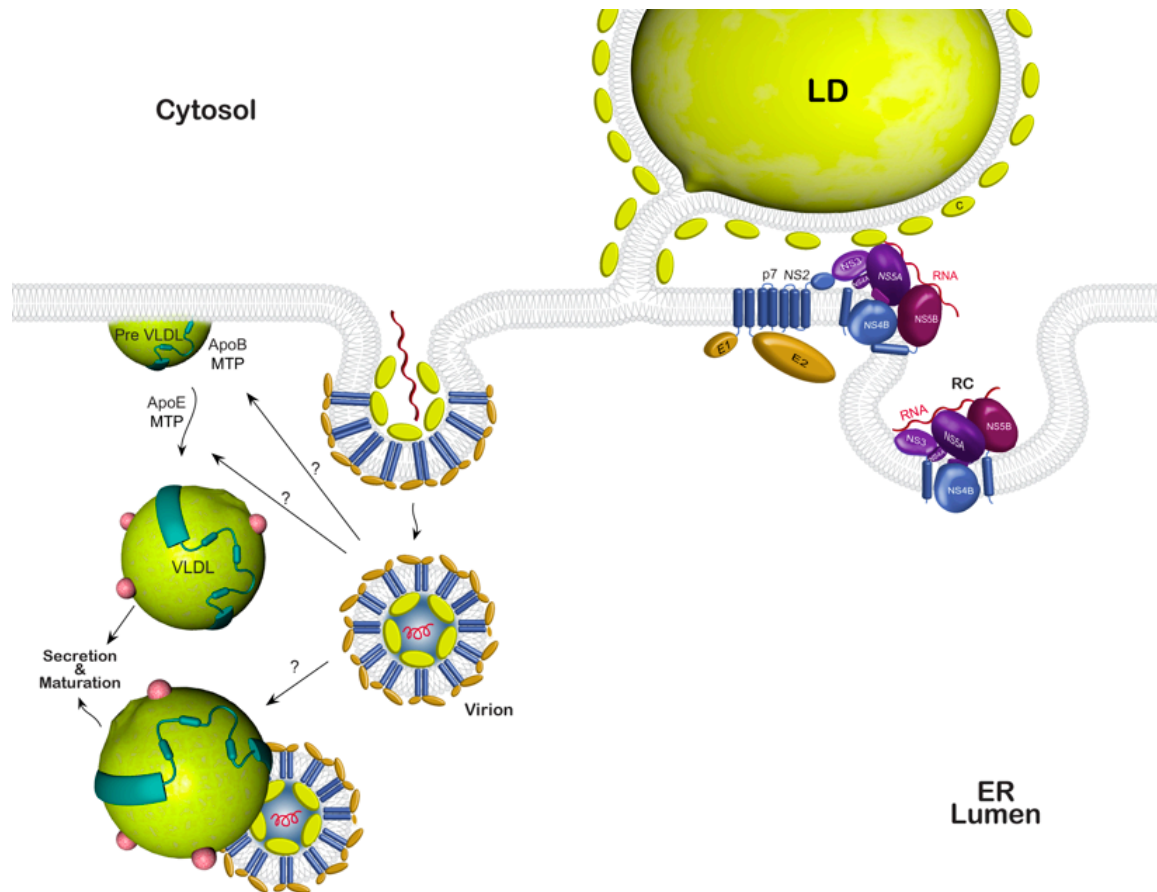
Les protéines NS5A et NS3 semblent être impliquées dans les étapes précoces de l'assemblage. Plusieurs études ont montré l'importance des aa sérines au sein du domaine III de NS5A pour la production virale (Masaki *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008a). La mutation de ces aa ou leur délétion abolit la co-localisation de NS5A et de C aux GLs inhibant ainsi l'interaction ARN/protéine de capsid (Masaki *et al.*, 2008). Il est possible que le rôle de la protéine NS5A soit d'acheminer l'ARN viral à proximité de la protéine de capsid pour favoriser son encapsidation. De son côté, NS3 semble également jouer un rôle important dans l'assemblage du virus. Mousseau et collaborateurs ont montré que la dimérisation de la protéine C est essentielle à son interaction avec NS3 au niveau des GLs (Mousseau *et al.*). Par ailleurs, des mutations d'adaptation localisées dans la séquence de NS3 se sont révélées cruciales pour la formation de la nucléocapsid virale sans que cela perturbe les interactions entre la protéine de capsid et NS5A ou l'ARN génomique (Han *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2007).

Le reste des protéines non-structurales participe également à l'assemblage et la formation des particules virales infectieuses, mais vraisemblablement à des étapes plus tardives par rapport à NS5A et NS3. La protéine p7 joue un rôle essentiel dans la production de virus infectieux et notamment dans une étape précoce de la morphogenèse du HCV et cela avant l'assemblage et la sécrétion des virions infectieux (Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). Les travaux réalisés avec des virus chimériques suggèrent que la protéine NS2 serait impliquée dans la production des particules virale infectieuses (Pietschmann *et al.*, 2006). Supprimer cette protéine ou muter la serine 168 en alanine ou glycine interfère sur la formation des particules virales infectieuses intra- et extracellulaires, indiquant que la NS2 est nécessaire à une étape post-assemblage de ces particules (Jones *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2009). La protéine NS2 pourrait jouer un rôle dans la convergence des glycoprotéines et des

particules naissantes, via ses interactions avec les protéines structurales et non structurales, pour former les virions infectieux du HCV (Ma *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2009).

❖ *Rôle des lipides*

Par ailleurs, l'assemblage et la sécrétion des HCV par les hépatocytes sont dépendants de la voie de production des VLDL (Figure 23). En effet, des particules virales infectieuses extra-cellulaires ont une densité plus faible que celle des particules intracellulaires, suggérant l'existence d'un événement de maturation lié aux lipides (Gastaminza *et al.*, 2006). Ainsi on observe que les virions circulant dans le sang sont associés à des VLDL riches en apoE et apoB (Andre *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007). De plus, les compartiments cellulaires liés à la réplication et l'assemblage du HCV contiennent également l'apoB, l'apoE et la protéine microsomale de transfert (MTP) qui représentent des facteurs nécessaires à l'assemblage des VLDL (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007). Il a été suggéré que l'apoB et la MTP constituent des facteurs limitant l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007). Cependant, ces résultats sont en contradiction avec des données récentes indiquant que la production virale n'est pas limitée par ces deux facteurs mais plutôt par l'apoE (Benga *et al.*, 2010; Jiang & Luo, 2009). Finalement, des données récentes suggèrent que les protéines Vps4 et ESCRT, facteurs impliqués dans la voie gouvernant la formation et le trafic des endosomes, participent à la sécrétion du HCV (Corless *et al.*, 2010).



(D'après (Tews *et al.*, 2010))

Figure 23 : Modèle d'assemblage du HCV

L'assemblage des particules virales débute dans le cytosol où la protéine de capside (C) (en jaune) est accumulée sur les gouttelettes lipidiques (LD). Les complexes de réplication sont recrutés aux gouttelettes lipidiques par des interactions entre la protéine C et des protéines non structurales pour encapsider l'ARN génomique du HCV. La capside néoformée bourgeonne au niveau de la membrane du RE pour s'envelopper et acquérir les glycoprotéines d'enveloppe (en orange). La maturation de la particule virale se fait par l'association à la voie d'assemblage des VLDL.

C. La protéine de capsid (C) du HCV

La protéine de la capsid (C) du HCV est la seule protéine intervenant dans la formation de la nucléocapsid virale qui renfermera le matériel génétique du virus. La maturation et l'assemblage de la nucléocapsid se fait en étroite liaison avec les membranes du RE et les gouttelettes lipidiques (GLs). Une fois formée, la nucléocapsid est ensuite enveloppée par bourgeonnement de la membrane du RE dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2 du HCV pour poursuivre les étapes tardives de la maturation.

1. Biogenèse et propriétés de la protéine C

La protéine C est située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine. Une séquence hydrophobe, servant de peptide signal à la translocation dans le RE de la glycoprotéine E1, est portée par l'extrémité C-terminale de la protéine. La libération et la maturation de la protéine C nécessitent deux clivages successifs par les enzymes de RE. Le premier est médié par une signal peptidase (SP) qui clive entre les protéines C et E1, en position 191, générant ainsi la forme immature de la protéine (191 aa, p23, 23 kD) (Santolini *et al.*, 1994). Une deuxième enzyme, une peptidase de signal peptide (SPP), clive dans le peptide signal de la protéine C, à une position qui reste controversée (aa 177-179) (Kopp *et al.*, 2010; McLauchlan *et al.*, 2002; Ogino *et al.*, 2004), libérant ainsi la forme mature (p21) qui sera envoyée aux GLs (Hussy *et al.*, 1996; McLauchlan *et al.*, 2002).

La forme mature de la protéine C est divisée en deux domaines (Boulant *et al.*, 2005; McLauchlan *et al.*, 2002). Composé des 117 premiers aa de la partie N-terminale de la protéine C, le premier domaine nommé D1 est riche en aa basiques et hydrophiles. Ce domaine pourrait participer à l'encapsidation de l'ARN génomique et à la formation de la nucléocapsid virale (Kim *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009). Une région d'interaction homotypique qui pourrait être impliquée dans l'oligomérisation de la protéine C a été également décrite dans ce domaine (Matsumoto *et al.*, 1996; Nolandt *et al.*, 1997). Situé entre l'aa 118 et la fin de l'extrémité C-terminale de la protéine C, le deuxième domaine (D2) contient deux hélices- α amphipathiques nécessaires à l'association de la protéine C aux membranes et aux GLs (Figure 24). Il assure également la mise en conformation du domaine D1 (Boulant *et al.*, 2006).

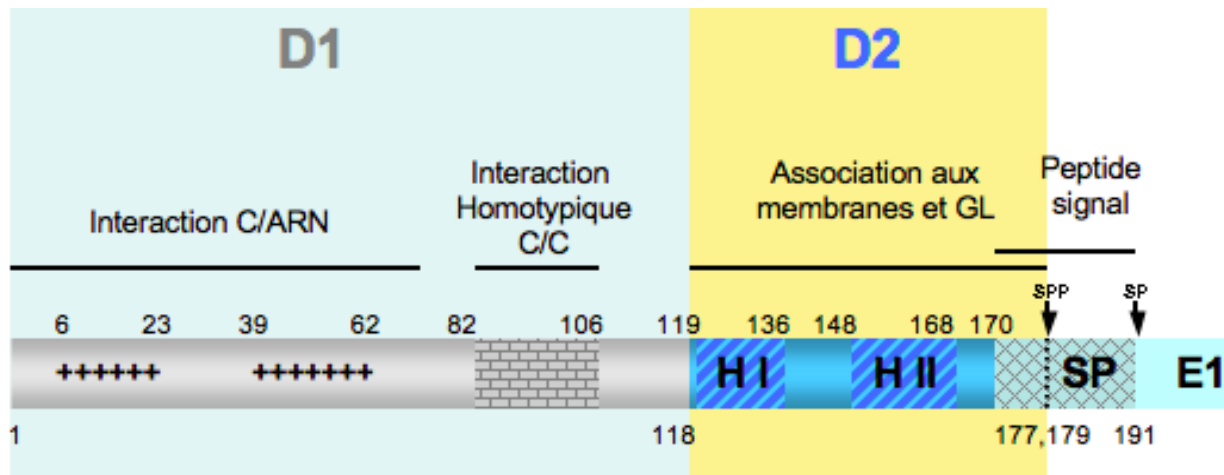


Figure 24 : Les différents domaines de la protéine de capsid

La protéine de capsid est constituée en deux domaines. Le premier domaine (D1) hydrophobe qui contient des résidus basiques impliqués dans l'interaction avec l'ARN viral et une région responsable de l'interaction homotypique C/C. Le deuxième domaine (D2) est hydrophobe. Il contient deux hélices- α (H I et H II) amphipathiques nécessaires à l'association de la protéine C aux membranes du RE et des GLs. La protéine C possède à son extrémité C-terminale un peptide signal nécessaire à la translocation de la glycoprotéine E1 dans la lumière du RE. Ce peptide est clivé par deux enzymes cellulaires SPP et SP pour libérer la forme mature de la protéine de capsid

2. La nucléocapside du HCV

Au cours du cycle viral du HCV, le rôle principal de la nucléocapside est de protéger puis de transmettre le matériel génétique du virus aux hépatocytes nouvellement infectés.

La structure et les propriétés de la nucléocapside virale ont été étudiées principalement *in vivo* en utilisant le virus isolé à partir des patients infectés. L'existence de nucléocapsides non enveloppées dans le sérum mais également dans des cellules infectées a été révélée (Ishida *et al.*, 2001; Kaito *et al.*, 1994; Maillard *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 1996). Comme pour les particules virales, le diamètre de la nucléocapside peut varier entre 30 et 43 nm ou plus et celle-ci peut prendre des formes variées (Ishida *et al.*, 2001; Kaito *et al.*, 1994; Maillard *et al.*, 2001). La signification biologique et les facteurs responsables de ces variations ne sont pas définis.

La densité des particules virales enveloppées, isolées du sérum ou produites en culture cellulaire, varie entre 1.03-1.23 g/ml (Gastaminza *et al.*, 2006; Pumeechockchai *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2010; Trestard *et al.*, 1998). Dans le même sens, les analyses biochimiques des nucléocapsides ont donné également des résultats contradictoires. En effet, les nucléocapsides préparées à partir des particules virales traitées avec un détergent ont une

densité de 1.25 g/ml ou 1.32-1.34 g/ml selon les auteurs (Kaito *et al.*, 1994; Maillard *et al.*, 2001), mais en microscopie électronique elles présentent les mêmes caractéristiques.

3. Modèles d'étude de l'assemblage de la nucléocapside

Le système HCVcc reproduisant le cycle viral n'est devenu accessible qu'à partir de 2005 (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Toutefois, plusieurs systèmes ont été mis au point pour étudier l'assemblage de la nucléocapside du HCV et ont permis de clarifier, dans une certaine limite, des déterminants et des étapes nécessaires à cet assemblage.

Un des premiers modèles d'étude utilisé a été d'exprimer des formes recombinantes de la protéine C dans des bactéries qui, après purification, ont été utilisées pour étudier l'assemblage de la nucléocapside virale en absence de facteurs cellulaires. Ce système a montré que la région N-terminale de la protéine C est essentielle pour son assemblage. Les nucléocapsides résultantes ressemblaient à celles isolées de patients infectés (Acosta-Rivero *et al.*, 2005; Fromentin *et al.*, 2007; Kunkel *et al.*, 2001; Lorenzo *et al.*, 2001; Majeau *et al.*, 2004). Cependant les résultats obtenus sur l'extrémité C-terminale de la protéine C tendent à montrer que cette extrémité favorise la formation des particules de formes irrégulières, ou que des protéines de capsid contenant ou ne contenant pas la séquence de cette extrémité sont capables de former des nucléocapsides identiques (Kim *et al.*, 2006; Kunkel *et al.*, 2001). Cette extrémité pourrait par contre être importante pour la stabilité et la conformation de la partie N-terminale de la protéine C. En effet, celle-ci semble subir des changements conformationnels lors de son assemblage (Kunkel & Watowich, 2002). En outre, compte tenu des résultats, il est difficile de savoir si la présence d'un ARN structuré (tel que le tARN ou la région 5'NC du génome viral) est nécessaire pour initier la multimérisation et l'assemblage de la protéine de capsid dans ce système (Acosta-Rivero *et al.*, 2005; Fromentin *et al.*, 2007; Kunkel *et al.*, 2001).

Klein et collaborateurs ont employé un autre modèle en combinant le système *in vitro* et un environnement cellulaire (Klein *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2004). Dans ce modèle, la protéine C est exprimée *in vitro* soit en utilisant un lysat de réticulocytes isolés à partir du lapin soit un extrait de germe de blé. Les deux formes de la protéine C, mature (173 aa) et immature (191 aa), étaient capables de s'assembler pour former des nucléocapsides identiques à celles trouvées chez les patients infectés (Klein *et al.*, 2004). L'analyse systématique des formes tronquées de la protéine de capsid, des délétions et des mutations a confirmé l'importance de la région N-terminale pour l'assemblage. Par ailleurs, cette approche a été

utilisée par Klein et collaborateurs pour étudier déjà l'importance des aa basiques, localisés à l'extrémité N-terminale de la protéine C, sur l'assemblage de la nucléocapside (Klein *et al.*, 2005).

Le premier modèle cellulaire pour étudier l'assemblage de la protéine C fut l'utilisation des cellules d'insectes (Baumert *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004; Maillard *et al.*, 2001). Ainsi, des structures ressemblant aux particules virales appelées VLP (pour : virus like-particles) ont été obtenues par surexpression des protéines structurales à l'aide d'un vecteur baculovirus. Parallèlement à l'étude de l'assemblage des protéines structurales, l'encapsidation de l'ARN a pu également être étudiée (Baumert *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2003). La levure fut également utilisée et des résultats analogues concernant la formation des nucléocapsides ont été obtenus (Acosta-Rivero *et al.*, 2003; Majeau *et al.*, 2004; Majeau *et al.*, 2005).

Blanchard et collaborateurs ont utilisé le réplicon du virus de la forêt de Semliki (SVF) pour exprimer les protéines structurales du HCV et analyser l'assemblage de la protéine C dans des cellules BHK-21 (pour Baby Hamster Kidney) (voir B 5.2) (Blanchard *et al.*, 2002; Blanchard *et al.*, 2003). Ce système a permis d'étudier le rôle de la protéine de capsid dans les étapes précoces de l'assemblage et du bourgeonnement sans pour autant obtenir une sécrétion des particules dans le milieu de culture. Ainsi, il a été montré que les aa correspondant aux deux hélices du domaine D2 et ceux situés entre les positions 88-106 de la protéine C ont un rôle important dans la morphogénèse du HCV, contrairement à ceux positionnés entre les aa 15 à 28 et 60 à 66 (Hourieux *et al.*, 2007a). En outre, Ait-Goughoulte et collaborateurs ont montré que l'inhibition du clivage du peptide signal par la SPP abolit l'assemblage de la nucléocapside (Ait-Goughoulte *et al.*, 2006).

À partir de 2005, la propagation du HCV en culture cellulaire a été obtenue et le cycle viral du HCV a pu être reproduit (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Depuis, de nombreuses études ont contribué à améliorer ce système (voir B 5.2). Les particules virales produites en culture cellulaire et leurs nucléocapsides ressemblent à celles isolées des patients (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Des études portant sur la capsid ont montré que le clivage du peptide signal (SPP) et la translocation de la protéine C vers les GLs sont des étapes cruciales pour l'assemblage du HCV (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Targett-Adams *et al.*, 2008b). Une mutagenèse des acides aminés situés entre les positions 57 à 191 a permis d'identifier de nombreux résidus importants pour la production virale. Cependant l'impact de ces mutations n'a pas été évalué sur la formation de la nucléocapside d'autant que certains résidus avaient été identifiés comme importants pour cette étape

d'assemblage (Kopp *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2007). Certains des mutants générés pouvaient restaurer leur infectiosité par l'apparition de mutations de compensation dans les protéines non-structurales, soulignant leur implication dans la production virale (Murray *et al.*, 2007).

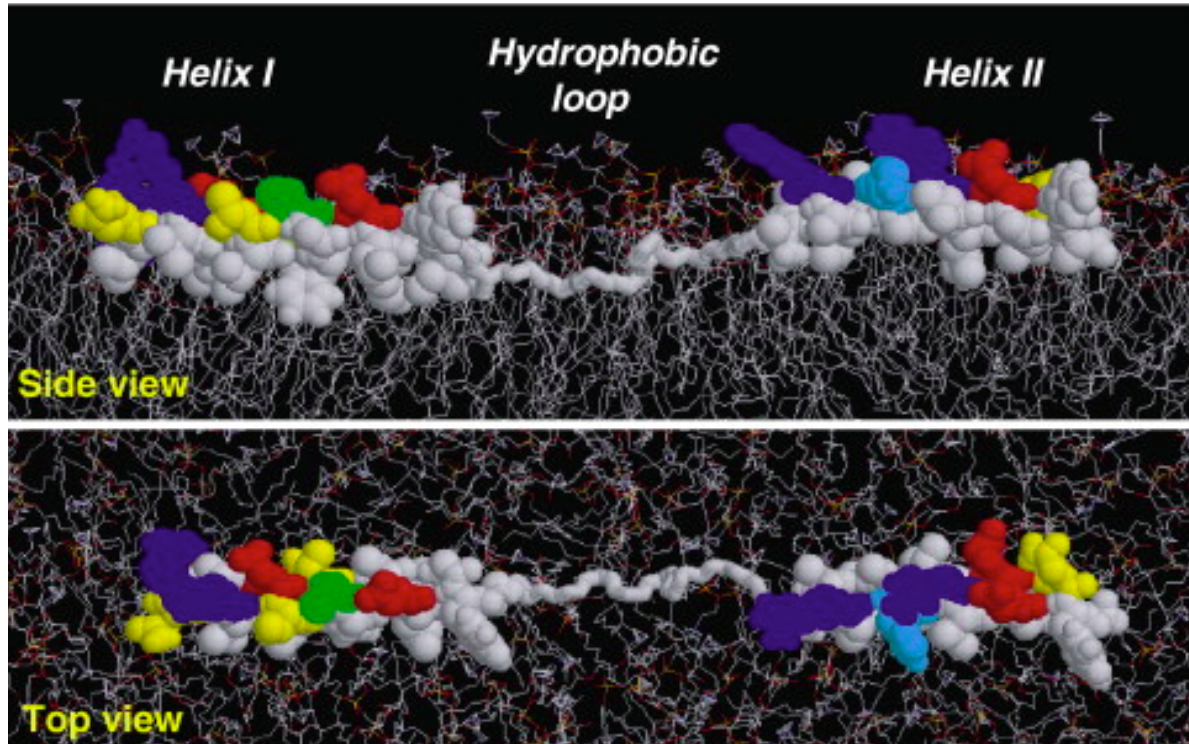
4. Association de la protéine C aux gouttelettes lipidiques (GLs)

La protéine C est connue pour ses propriétés membranaires et son association aux GLs (Barba *et al.*, 1997; Moradpour *et al.*, 1996). Utilisant le système HCVcc, il a été confirmé que, dans les cellules infectées, la protéine C est associée principalement aux GLs et que les étapes précoces de l'assemblage du HCV nécessitent cette interaction (Miyanari *et al.*, 2007; Rouille *et al.*, 2006). Comme nous l'avons déjà précisé la maturation de la protéine C implique plusieurs protéases du RE (SP et SPP) et si l'on modifie certains résidus du peptide signal (ASC 180/3/4 → VLV), le clivage est inhibé et par conséquent l'assemblage de la protéine C également (Ait-Goughoulte *et al.*, 2006; Hope *et al.*, 2006; McLauchlan *et al.*, 2002).

L'interaction entre la protéine C et les GLs se fait par le domaine D2 qui se localise entre les aa 118-179 (Boulant *et al.*, 2005; Hope *et al.*, 2002). Ces résultats ont été obtenus grâce aux fusions réalisées entre ce domaine et les séquences codant la protéine GFP (Boulant *et al.*, 2006). Ainsi deux hélices alpha amphipathiques (Hélices I et II), séparées par une courte boucle hydrophobe HL (pour hydrophobic loop) non structurée, ont été identifiées. Les résidus hydrophobes de chaque hélice interagissent avec les phospholipides de la monocouche des GLs (Figure 25) (Boulant *et al.*, 2006). La modification de ces résidus hydrophobes perturbe le repliement des hélices et abolit l'association de la protéine C avec les GLs (Boulant *et al.*, 2006). Il semblerait que le repliement incorrect du domaine D2 induise une conformation inappropriée de celui de D1 rendant la protéine C plus sensible à la dégradation par la machinerie cellulaire. Dans le travail de Murray et collaborateurs, les délétions et les mutations introduites au niveau du domaine D2 ont montré l'importance de ce domaine pour la stabilité de la protéine C et donc pour la production des virions infectieux (Murray *et al.*, 2007).

Progressivement, au cours de l'infection la protéine C s'associe aux GLs et ce processus coïncide avec l'augmentation du titre viral (Boulant *et al.*, 2007). Si certaines mutations au niveau du domaine D2 abolissent cette association, d'autres se révèlent plus favorables au virus (Miyanari *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007). En effet, la force de

l'interaction de la protéine C avec les GLs aurait une forte influence sur la production virale. Ainsi, le changement de l'alanine 147 de la région hydrophobe (HL) en valine (A147V) augmente l'interaction et donc le recrutement de la protéine C aux GLs favorisant ainsi une meilleure production et sécrétion de particules infectieuses (Shavinskaya *et al.*, 2007).



(D'après (McLauchlan, 2009))

Figure 25 : Le domaine D2 de la protéine de capsid et son association aux membranes

Modèle représentant l'interaction des deux hélices α amphipathiques du Domaine D2 de la partie C-terminale de la protéine de capsid avec les membranes. Les résidus hydrophobes sont orientés vers la couche lipidique des membranes (en gris), tandis que les résidus hydrophiles sont orientés vers le cytoplasme (en couleur). Les deux hélices sont séparées par une boucle hydrophobe.

Après la translocation de la protéine de capsid vers les GLs, ces dernières servent d'usines d'assemblage des particules virales (voir B 5.4). Plusieurs rapports ont montré un recrutement des protéines non-structurales et plus spécifiquement des protéines NS3 et NS5A, et de l'ARN génomique à proximité de la protéine C associée aux GLs (Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007; Mousseau *et al.*, 2010; Rouille *et al.*, 2006; Targett-Adams *et al.*, 2008a). Ces données montrent que la protéine C orchestre le processus de l'assemblage viral.

5. Interaction protéine C/ARN génomique et encapsidation

La fonction majeure de la protéine C est d'encapsider l'ARN génomique du HCV. La continuité et la persistance d'une infection virale est garantie uniquement par la transmission du génome viral vers de nouvelles cellules pour reproduire le cycle infectieux.

Par analogie avec d'autres virus, la protéine C est capable d'interagir avec l'ARN génomique du HCV, une étape cruciale dans l'assemblage viral (Fan *et al.*, 1999; Santolini *et al.*, 1994; Shimoike *et al.*, 1999) et comme nous l'avons déjà mentionné implique l'extrémité N-terminale du domaine D1 (Fromentin *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2005; Majeau *et al.*, 2004; Santolini *et al.*, 1994). Ce dernier est un domaine hydrophile riche en aa basiques très conservés qui sont principalement localisés dans deux régions constituées des aa 6 à 23 et 39 à 62 (Boulant *et al.*, 2005; Bukh *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 2005). Ces résidus basiques sont vraisemblablement responsables de l'interaction entre la protéine C et l'ARN du HCV (Fromentin *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2005; Shimoike *et al.*, 2006). Mais, la spécificité de cette interaction reste controversée. En effet, dans certains travaux, la protéine C interagirait spécifiquement avec la région 5'NC du génome viral (Fan *et al.*, 1999; Shimoike *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009), alors que dans d'autres celle-ci peut être remplacée par un autre ARN structuré tel que tARN (Fromentin *et al.*, 2007; Kunkel *et al.*, 2001; Majeau *et al.*, 2004) suggérant que l'assemblage de la protéine C exige plutôt la présence d'un ARN structuré. Par ailleurs, les séquences non structurées de l'ARN génomique du HCV n'interagissent pas avec la protéine de capsid (Shimoike *et al.*, 1999). En outre, des expériences de transcomplémentation ont montré que des réplicons subgénomiques répliatifs (protéines NS3 à NS5B) peuvent être encapsidés suggérant que la séquence codant les protéines C à NS2 ne contient pas de signaux d'encapsidation indispensables (Pacini *et al.*, 2009; Steinmann *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2009).

Le mécanisme expliquant la spécificité de l'interaction entre la protéine C et l'ARN génomique du HCV n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, l'implication de certaines protéines virales non-structurales, notamment NS3 et NS5A, dans les étapes précoces de l'assemblage pourrait en partie expliquer l'interaction spécifique protéine C/ARN viral (Ma *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Ces deux protéines jouent un rôle dans le recrutement des complexes de réplication aux GLs où la protéine C s'accumule (voir B 5.4). D'autre part, la protéine de capsid semble interagir plus spécifiquement avec le SLIII (Stem Loop III) de la région 5'NC. La séquence nucléotidique et la structure di- et tridimensionnelle de cette partie de l'ARN viral pourraient être des

déterminants importants pour cette spécificité (Carmona & Molina, 2010; Shimoike *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009).

6. Rôle de la Protéine C dans la traduction et la réplication virales

Le génome du HCV possède un site IRES à son extrémité 5'NC qui contrôle la traduction des protéines virales dont certaines d'entre-elles participeront ensuite à la formation des complexes de réplication. Différentes études indiquent que la protéine C et sa séquence codante sont à la fois impliquées dans la régulation de la traduction et la réplication de génome du HCV (Li *et al.*, 2003; McMullan *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 1995; Vassilaki *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2002).

Bien que la majorité des IRES viraux se limitent à la région 5'NC, l'IRES du HCV semble s'étendre au delà de cette région et empiéter sur la séquence codant la protéine C. Le HCV partage cette propriété avec le GBV-B et les pestivirus (Lindenbach *et al.*, 2007). Ainsi, Reynolds et collaborateurs ont montré qu'environ 30 nucléotides en aval du codon d'initiation AUG de la séquence codant la protéine C sont nécessaires à la traduction dépendant de l'IRES du HCV (Reynolds *et al.*, 1995). Des mutations non-sens introduites dans cette région diminuent considérablement la traduction dépendant de l'IRES (Honda *et al.*, 1996b). Riche en résidus adénosine dans cette région, l'ARN viral ne peut pas se structurer correctement (Rijnbrand *et al.*, 2001). En fait, il a été suggéré qu'un des critères essentiels à la fonctionnalité de cette séquence soit l'absence d'une structure stable immédiatement en aval du codon d'initiation. La présence d'une telle structure inhibe la traduction médiée par l'IRES du HCV (Rijnbrand *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'extrémité 5' de la séquence codant la protéine C du HCV contient des structures secondaires très conservées appelées SLV et SLVI (pour Stem Loop V et VI) (Figure 26). Il s'agit de deux tiges boucles situées au niveau de la séquence correspondant aux acides aminés 16 à 56 de la protéine C (Smith & Simmonds, 1997). L'utilisation de réplicons sous-génomiques, qui sont délétés pour ces régions, indiquent que leur réplication ne nécessite pas ces éléments (Blight *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 1999). Toutefois, il a récemment été montré que ces structures sont impliquées dans la régulation de la réplication virale *in vivo* et *in cellulo* (McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008). L'introduction dans ces tiges boucles de mutations à l'origine de mésappariements dans l'ARN du HCV de génotype 1a est responsable d'une forte diminution de la réplication virale (McMullan *et al.*, 2007). Au cours de ces expériences, la séquence en aa de la capsid n'a

jamais été modifiée. La réplication du HCV de génotype 2a semble également être atténuée mais à un niveau moindre comparé au génotype 1a (Vassilaki *et al.*, 2008). L'intégrité structurale de SLV et de SLVI serait nécessaire à la traduction des protéines virales *in cellulo* (Vassilaki *et al.*, 2008). Ces structures pourraient être impliquées dans des interactions ARN-ARN. Des tiges boucles situées en aval de ces SLV et SLVI dans la séquence codant la protéine C ne semble jouer aucun rôle dans le cycle viral du HCV (Vassilaki *et al.*, 2008).

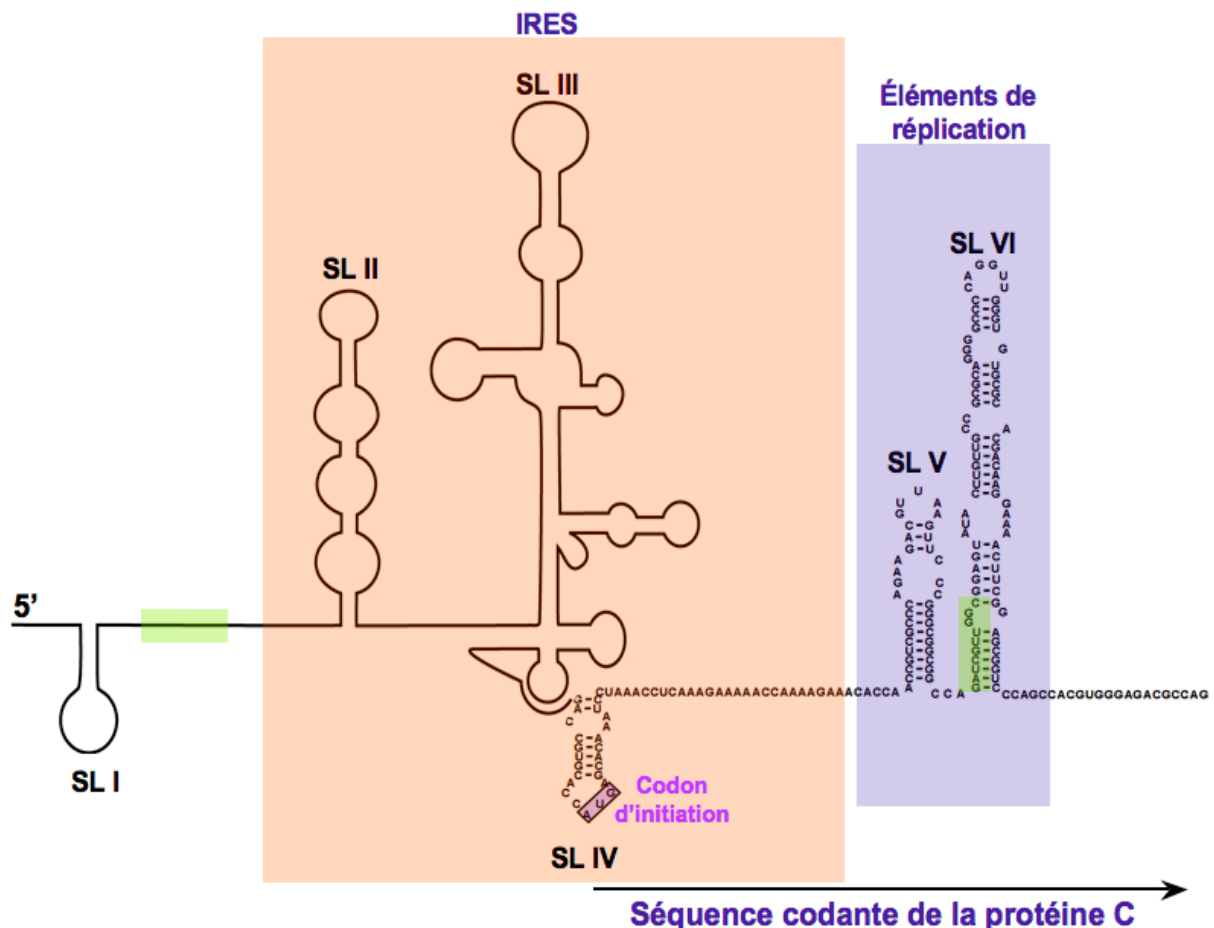


Figure 26 : Structure et éléments de la région 5'NC et la protéine C du génome de HCV

L'IRES du HCV (en saumon) est composé des tiges boucles SL II, III, IV de la région 5' NC du génome viral et le début de la séquence codant la protéine de capsid. La séquence codant la protéine de capsid (C) contient également des éléments (tige boucles SL V et VI) impliqués dans la réplication du génome du HCV (en violet). Les séquences impliquées dans des interactions ARN-ARN à distance, et qui modulent la traduction dépendante de l'IRES, sont marquées en vert

Des études ont suggéré que la protéine C a une fonction régulatrice sur la traduction et la réplication. Elle peut agir sur l'IRES pour inhiber de façon dose dépendante la traduction du HCV (Li *et al.*, 2003; Shimoike *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). Des concentrations faibles de la protéine augmentent l'activité de l'IRES par contre celles qui sont les plus élevées l'inhibent (Boni *et al.*, 2005). Les 20 premiers aa de la région N-terminale de la

protéine C et la tige boucle III de l'IRES viral ont été identifiés comme les principaux facteurs impliqués dans ce processus (Li *et al.*, 2003; Shimoike *et al.*, 2006). Toutefois, Wang et collaborateurs suggèrent que cet effet est principalement dû à la séquence nucléotidique et non à la protéine elle-même (Wang *et al.*, 2000). D'autre part, la protéine C est capable de moduler la réplication virale en agissant sur la traduction, mais également en interagissant avec la protéine NS5B, la réplicase virale (voire I.B.4.8) (Kang *et al.*, 2009; Uchida *et al.*, 2002). Une interaction entre les 75 premiers aa de la région N-terminale de la protéine C et la partie N-terminale de NS5B, correspondant aux domaines des doigts et de la paume, inhibe l'activité polymérasique de NS5B (Kang *et al.*, 2009). Par ailleurs, une interaction de la protéine C avec l'extrémité 3' NC de l'ARN génomique, impliquée dans la réplication et la traduction virales, pourrait représenter un autre mécanisme pour moduler la réplication du HCV (Ivanyi-Nagy *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009). Le HCV pourrait utiliser toutes ces interactions pour contrôler les différentes transitions (traduction, réplication, assemblage) au cours de son cycle viral.

7. Interaction Protéine C/cellule hôte

En dehors de son rôle dans la morphogenèse de la particule virale, la protéine C est aussi impliquée dans de nombreuses interactions avec des protéines cellulaires. Elles ont pour effet de contourner l'immunité de l'hôte et de détourner la machinerie cellulaire au profit du virus conduisant à la persistance virale ou à la mise en place de la fibrose, la stéatose, la cirrhose ou le HCC.

Différentes études ont suggéré que la protéine C joue un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire, la première étape vers la chronicité. Ainsi en interagissant avec les protéines STAT dans la voie de signalisation à l'IFN, la protéine C inhibe la réponse immunitaire innée liée à l'IFN (Bode *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006). La réponse immunitaire cellulaire peut être inhibée par la protéine C selon plusieurs mécanismes comme le blocage de la présentation d'antigène, l'inhibition de la différenciation des cellules T et B ou en favorisant les lymphocytes T régulateurs (Treg) (voir A 5.2) (Krishnadas *et al.*, 2010; Sarobe *et al.*, 2002; Waggoner *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010). Elle est également capable de moduler l'apoptose des cellules infectées par ses propriétés pro- et anti-apoptotiques qui peuvent être impliquées dans la pathologie de l'hépatite et de son évolution (Benali-Furet *et al.*, 2005; Mohd-Ismail *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2006). Par ailleurs, le HCV est associé au dysfonctionnement des mitochondries et à l'augmentation du stress oxydatif. Ce stress se

caractérisée par une production élevée de ROS/RNS (Reactive Oxygen/Nitrogen Species) et une diminution des antioxydants dans les cellules infectées, qui pourrait être impliqué dans l'évolution vers la fibrose hépatique et le carcinome hépatocellulaire (Dionisio *et al.*, 2009; Korenaga *et al.*, 2005).

La stéatose représente une des complications les plus fréquentes qui touche plus de 50% des patients chroniquement infectés par le HCV (Asselah *et al.*, 2006). La protéine C agit sur le mécanisme de la stéatose du fait qu'elle est capable d'interagir avec les GLs et d'interférer sur leur métabolisme et leur accumulation dans les cellules infectées (Piodi *et al.*, 2008). Des études récentes suggèrent que la protéine C du génotype 3a serait responsable d'une fréquence plus élevée de la stéatose pour ce génotype comparée aux autres génotypes (Hourieux *et al.*, 2007b; Jhaveri *et al.*, 2008). Un à quatre pourcents des personnes infectées avec le HCV développent un carcinome hépatocellulaire qui est la phase finale d'une hépatite chronique (EASL, 1999; Lauer & Walker, 2001). Les mécanismes liant l'hépatite C au HCC ne sont pas encore élucidés. Cependant, la stéatose et le stress oxydatif induits par la protéine C peuvent être impliqués dans le développement du HCC (Machida *et al.*, 2004), tout comme son action sur des protéines cellulaires anti-tumorales telle que les protéines p21, p53 et p73 (Alisi *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2002).

8. Les autres protéines codées par la séquence codante de la protéine C

En plus de la protéine C, deux autres protéines multiformes sont également codées par la séquence codant la protéine C.

8.1. La protéine F ou ARFP

Parallèlement à la synthèse de la polyprotéine virale, une petite protéine de 16-17 kD nommée F (pour Frameshift), ARFP (Alternative Reading Frame Protein) ou Core +1 est synthétisée. Cette protéine est issue d'un décalage ribosomique -2/+1 du cadre de lecture au niveau des codons 8-11 de la séquence codant la protéine C. La protéine F partage avec cette dernière les premiers aa de la région N-terminale (Varaklioti *et al.*, 2002; Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). La taille de la protéine F est variable en fonction des génotypes allant de 126 aa, pour le génotype 2a, à 162 aa pour le génotype 1a (Xu *et al.*, 2001). D'autres équipes ont décrit des formes plus courtes de la protéine F, issues des initiations internes de la

traduction au niveau des codons 26 et 85-87 de la protéine C. (Baril & Brakier-Gingras, 2005; Vassilaki & Mavromara, 2003). Une autre forme de cette protéine, issue d'un décalage +1 au codon 42 et un autre -1 au codon 144, a été également décrite pour le génotype 1b (Boulant *et al.*, 2003).

La localisation intracellulaire de la protéine F semble varier également en fonction des génotypes. Cette localisation est plutôt péri-nucléaire ou mitochondriale pour le génotype 1a, alors qu'elle est plus diffuse dans le cytoplasme pour le génotype 2a (Ratinier *et al.*, 2009; Roussel *et al.*, 2003). Cette protéine a une demi-vie très courte qui est estimée à dix minutes (Roussel *et al.*, 2003). Des réponses immunitaires cellulaires et humorales anti-F ont été décrites chez des patients chroniquement infectés indiquant son expression durant l'infection par le HCV (Bain *et al.*, 2004; Walewski *et al.*, 2001). Toutefois, la fonction de la protéine F n'est pas encore clairement définie, mais elle ne semble pas nécessaire à la production virale (McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008). Des fonctions immuno-modulatrices ou encore oncogéniques de cette protéine ont été suggérées pour l'évolution de la maladie et le développement du HCC (Fiorucci *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

8.2. La protéine minicore

Récemment, Eng et collaborateurs ont détecté dans des cellules contenant un réplicon génomique de génotype 1b une nouvelle forme de la protéine C dont le poids moléculaire apparent est de 8 kD (p8) (Eng *et al.*, 2009). À cette protéine, nommée minicore, il manque l'extrémité N-terminale de la protéine C. En effet, Cette nouvelle forme pourrait être le résultat d'une initiation interne au niveau du codon 91 de la protéine C (Eng *et al.*, 2009). Les souches JHF1 et J6 de génotype 2a et la souche H77 de génotype 1a sont capables de produire, en plus de la forme p8, d'autres formes allant de 8 kD à 14 kD. Comme p8, ces minicores sont dépourvues de l'extrémité N-terminale de la protéine C (Eng *et al.*, 2009).

Le rôle de ces minicores n'est pas encore clairement connu. Ces protéines ne sont pas retrouvées au niveau de la structure de la capsid. Néanmoins, elles seraient capables d'interagir avec les GLs par l'extrémité C-terminale et les moduler en faveur de la production virale. Il est possible qu'elles soient également capables d'interagir avec la membrane externe des mitochondries grâce à un signal localisé entre les aa 149 à 158 et identifié auparavant par Schwer et collaborateurs (Schwer *et al.*, 2004). Ceci suggérerait un rôle modulateur de l'apoptose tout comme la protéine C. De plus, la mutation U271A dans le génome viral du HCV de génotype 1b, qui confère une résistance à l'interféron, augmente l'expression de la

protéine minicore p8 (Eng *et al.*, 2009). Ces fonctions nécessitent des études plus approfondies.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL

De nombreux détails de la morphogenèse virale du HCV n'ont toujours pas été complètement élucidés malgré les avancées réalisées depuis 2005 avec le système de culture HCVcc. Comme nous l'avons vu dans la partie (I.B.5.4), l'assemblage des virions du HCV débute par l'encapsidation de l'ARN génomique et la formation de la nucléocapside virale par la protéine de capsid (C). Cette étape se fait dans un environnement membranaire et avec la participation de protéines virales non structurales. Les nucléocapsides néoformées sont enveloppées par bourgeonnement au niveau de la membrane du RE pour suivre les voies de maturation et de sécrétion. Le rôle de la protéine C dans la morphogenèse et la production virales a fait l'objet de deux publications récentes (Kopp *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2007). Elles ont mis en évidence l'importance de nombreux résidus entre les aa 57 et 191 dans ce processus mais sans tenir compte des aa de la partie N-terminale. Cette région de la protéine C est très riche en aa arginines et lysines qui sont des aa chargés positivement. Dans la séquence peptidique, ces résidus très conservés se regroupent dans deux régions localisées entre les aa 6 à 23 et les aa 39 à 62. Des résultats obtenus à l'aide de vecteurs d'expression *in vitro* suggèrent que la partie N-terminale de la protéine est nécessaire à l'interaction avec l'ARN génomique du HCV et à l'assemblage de la nucléocapside virale. Toutefois, le rôle exact de cette région N-terminale de la protéine C n'a jamais été étudié durant le cycle viral du HCV.

L'objectif de cette thèse était de déterminer le rôle des aa basiques de la partie N-terminale de la protéine de capsid dans l'infectiosité du HCV. Pour cela, nous avons utilisé le système infectieux mis au point par le Dr Wakita et qui a été amélioré au laboratoire et dénommé JFH1/CS-N6-A4 (Delgrange *et al.*, 2007; Goueslain *et al.*, 2010). Des modifications ont été introduites dans le génome viral pour permettre ; i) une meilleure sécrétion dans le milieu extracellulaire de la particule virale (mutations CS dans la capsid) ; ii) une meilleure interaction du virus avec le récepteur CD81 (mutation N6 dans E2) pour favoriser son entrée dans la cellule ; iii) et finalement pour permettre une meilleure détection de l'expression de la protéine E1 par l'anticorps monoclonal A4 (MAb A4) au cours de l'infection. Les différents résidus basiques de la partie N-terminale de la capsid ont été modifiés par mutagenèse dirigée pour ensuite évaluer leur implication dans la production virale du HCV. Ainsi nos résultats suggèrent que la première région (aa de 6 à 23) joue un rôle limité dans l'assemblage du HCV alors que la seconde région (aa de 39 à 62) semble plus

déterminante. Nous avons alors identifié quatre aa basiques (R50, K51, R59 et R 62) comme cruciaux pour la morphogenèse du virus de l'hépatite C.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la publication suivante :

Khaled Alsaleh, P-Y. Delavalle, A. Pillez, G. Duverlie, V. Descamps, Y. Rouillé, J. Dubuisson and C. Wychowski (2010). Identification of Basic Amino Acids at the N-Terminal End of the Core Protein That Are Crucial for Hepatitis C Virus Infectivity. *J. Virol.*, **84** (24), 12515-12528.

RESULTATS

III. RESULTATS

Article

**Quatre Résidus basiques de l'extrémité N-terminale
de la protéine de capsid sont essentiels à
l'infectiosité du HCV**

Identification of Basic Amino Acids at the N-Terminal End of the Core Protein That Are Crucial for Hepatitis C Virus Infectivity[∇]

Khaled Alsaleh,^{1,2,3} Pierre-Yves Delavalle,^{1,2,3} André Pillez,^{1,2,3} Gilles Duverlie,⁴ Véronique Descamps,⁴ Yves Rouillé,^{1,2,3} Jean Dubuisson,^{1,2,3} and Czeslaw Wychowski^{1,2,3*}

INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Center for Infection and Immunity of Lille, Institut de Biologie de Lille, F-59021 Lille, France¹; Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France²; Institut Pasteur de Lille, F-59019 Lille, France³; and Unité de Virologie Clinique et Fondamentale, Université de Picardie Jules Verne and CHU d'Amiens, F-80054 Amiens CxI, France⁴

Received 3 July 2010/Accepted 30 September 2010

A major function of the hepatitis C virus (HCV) core protein is the interaction with genomic RNA to form the nucleocapsid, an essential component of the virus particle. Analyses to identify basic amino acid residues of HCV core protein, important for capsid assembly, were initially performed with a cell-free system, which did not indicate the importance of these residues for HCV infectivity. The development of a cell culture system for HCV (HCVcc) allows a more precise analysis of these core protein amino acids during the HCV life cycle. In the present study, we used a mutational analysis in the context of the HCVcc system to determine the role of the basic amino acid residues of the core protein in HCV infectivity. We focused our analysis on basic residues located in two clusters (cluster 1, amino acids [aa]6 to 23; cluster 2, aa 39 to 62) within the N-terminal 62 amino acids of the HCV core protein. Our data indicate that basic residues of the first cluster have little impact on replication and are dispensable for infectivity. Furthermore, only four basic amino acids residues of the second cluster (R50, K51, R59, and R62) were essential for the production of infectious viral particles. Mutation of these residues did not interfere with core protein subcellular localization, core protein-RNA interaction, or core protein oligomerization. Moreover, these mutations had no effect on core protein envelopment by intracellular membranes. Together, these data indicate that R50, K51, R59, and R62 residues play a major role in the formation of infectious viral particles at a post-nucleocapsid assembly step.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (30) as well as several extrahepatic diseases (21). It has been reported that an estimated 170 million people are chronically infected with HCV worldwide (43). The currently approved treatment is a combination of pegylated alpha interferon (pegIFN- α) and ribavirin, which is effective in approximately 54% of infected patients (31).

HCV is the only member of the *Hepacivirus* genus in the *Flaviviridae* family. It is an enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus, and its genome encodes a unique open reading frame, which is flanked by two structured nontranslated regions at its 5' and 3' ends (5' NTR and 3' NTR, respectively). The introduction of viral genome into cells leads to its translation, mediated by an internal ribosome entry site (IRES) (53). The resulting polyprotein is then processed by cellular and viral proteases (18, 20) to produce the core protein and the envelope glycoproteins E1 and E2, required for infectious virus particles production. The remaining proteins, NS2 through NS5B, are necessary for the intracellular processes of the virus life cycle. Furthermore, a small integral membrane protein, p7, has been reported to function as an ion channel (19, 42).

The HCV core protein is a basic protein, located in the N-terminal portion of the HCV precursor polyprotein. The release of core protein from the downstream E1 glycoprotein sequence requires the action of two coordinated cleavage events. The first cleavage, involving a signal peptidase (SP) (20, 49), is responsible for the anchorage of the core protein in the endoplasmic reticulum (ER) membrane through a C-terminal hydrophobic region (18). The second cleavage, mediated by a signal peptide peptidase (22, 34), is crucial for the release of the core protein from ER membrane and its targeting to lipid droplets (LDs) (6, 34). Targeting of core protein to lipid droplets was initially described by Barba and coworkers (3) and Moradpour and coworkers (37). The mature core protein that forms the viral nucleocapsid is a dimeric, α -helical protein constituted of D1 and D2 domains (8, 34). The D1 domain, composed of the N-terminal 117 amino acids (aa), contains a high proportion of basic residues involved in RNA binding and oligomerization of core protein (8, 13, 50, 52). The hydrophobic D2 domain, beginning at aa 118, has a length of about 55 aa and is involved in the targeting of HCV core protein to lipid droplets (6). Although the C-terminal end of D2 has not been mapped precisely, it likely ends between aa 177 and 182 (22, 27, 41). Furthermore, it has been shown that the folding of the D2 domain occurs in a membrane environment and is critical for the folding of the D1 domain (8). In infected cells, the lipid droplets and their associated membranes are the only subcellular compartments in which the HCV core protein accumulates and are probably the site of particle assembly (7, 36, 47). Beyond its role in the viral

* Corresponding author. Mailing address: Équipe Hépatite C, Center for Infection and Immunity of Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP447, 59021 Lille cedex, France. Phone: 33 3 20 87 10 27. Fax: 33 3 20 87 12 01. E-mail: czeslaw.wychowski@ibl.fr.

[∇] Published ahead of print on 13 October 2010.

nucleocapsid assembly, the core protein has been shown to be involved in multiple interactions with cellular proteins, suggesting its implication in some cellular functions (44).

The major breakthrough since the discovery of HCV was the production of infectious virus in cell culture (HCVcc) (29, 55, 58). The advent of this infectious cell culture system has allowed many fundamental and applied studies to be achieved. However, many details of viral morphogenesis and infectivity are still needed to complete our knowledge. The role of the core protein in HCV infectivity has been previously investigated by alanine scanning mutagenesis or by genetic analysis (27, 40). These reports highlighted the involvement of numerous amino acids in the production of infectious virus. Other studies, using cell-free and protein expression systems, reported that the N-terminal region of the core protein is important for HCV nucleocapsid assembly (15, 25, 26) and core protein-RNA interaction (49, 57). However, this region of the core protein has not been fully investigated in the context of the HCVcc system. In this study we examined the involvement of two clusters of basic residues at the N terminus of the core protein in the replication and infectivity of HCV. We identified four basic residues essential for the production of infectious HCV particles.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Huh-7 and Huh-7w7 (CD81⁻) cells (46) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and supplemented with 100 nM nonessential amino acids (NEAA; Invitrogen). Huh-7w7 (CD81⁻) cells support viral replication and virus production but cannot be reinfected with the virus. These cells were used in this study for viral titration and replication experiments to avoid any effect of reinfection, which allows the mutants to be tested in a single-cycle production assay (48).

Antibodies. Mouse anti-core protein monoclonal antibodies (MAbs) (ACAP-27/IgG2a and 2H9/IgG1) were kindly provided by J. F. Delagneau and T. Wakita (National Institute of Infectious, Tokyo, Japan), respectively. Rat MAb anti-E2 (3/11) (14), kindly provided by J. A. Mckeating, and mouse MAb anti-E1 (A4) (12) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus), according to the manufacturer's instructions. Mouse MAb anti-NS5A (9E10/IgG2a) was kindly provided by C. M. Rice (The Rockefeller University). Goat anti- β -actin polyclonal antibody was from Santa Cruz. All conjugated secondary antibodies for indirect immunofluorescence (IF) were from Invitrogen. Peroxidase-conjugated donkey anti-goat IgG was from Santa Cruz, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG was from Jackson ImmunoResearch, and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG was from Sigma.

Plasmid construction. Mutants used in this study were based on the genotype 2a plasmid pJFH1/CS-N6-A4 (11, 17). In this work, this virus is referred to as JFH1 or wild type (wt). All core protein mutations and pJFH1/CS-N6-A4 with a deletion of residues 62 to 160 in the core protein [pJFH1/CS-N6-A4/ Δ core (62–160)] were introduced into the plasmid by standard PCR methods using AgeI, FspAI, and BsiWI sites in pJFH1/CS-N6-A4 plasmid. pJFH1/CS-N6-A4/ Δ E1E2 and pJFH1/CS-N6-A4/GND mutants were constructed as described previously (55). The pJFH1/CS-N6-A4/NS5A-Gluc plasmid was constructed by introducing a small nucleotide sequence to create two unique sites, NruI and BglII, and leading to the insertion of four amino acids, RSSR, between aa 2394 and 2395 of the NS5A protein (38). The coding sequence of the nonsecreted form of *Gaussia* luciferase (Gluc) was cloned between these two sites. All mutations were also introduced into this reporter construction for replication study. Mutants with Gluc were not infectious or only very poorly infectious.

To construct the wt and mutant core protein-expressing pcDNA3.1 plasmids, DNA fragments encoding the core protein gene from wt and mutant genomes were generated by PCR using primers containing EcoRI and XbaI restriction sites. The resulting sequence was then cloned into pcDNA3.1 to obtain pcDNA/core-wt, pcDNA/core-R50, pcDNA/core-K51, pcDNA/core-R59, and pcDNA/core-R62 plasmids.

***In vitro* transcription.** Viral RNA was prepared as described previously (11, 17). Briefly, plasmids linearized by XbaI and treated with Mung bean nuclease were transcribed using a MEGAscript kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. After 4 h of incubation at 37°C, the DNA template was degraded by DNase treatment for 15 min at 37°C. Synthesized RNA was precipitated by LiCl and then purified and quantified by absorbance at 260 nm.

RNA transfection. Cells were electroporated using *in vitro* transcribed viral RNA as described previously (23). Briefly, 4×10^6 cells in OptiMEM (Invitrogen) were electroporated with 10 μ g of viral RNA. For replication analysis, electroporated Huh-7w7 cells with Gluc-harboring mutants were plated in 24-well plates and lysed with 100 μ l of $1 \times$ *Renilla* lysis buffer (Promega) at 4 h and 72 h postelectroporation. Twenty microliters of cell lysate was used to determine the luciferase activity. Values at 72 h were normalized relative to those at 4 h.

Virus titration. Clarified Huh-7w7 cell culture supernatants of T25 flasks harvested at 72 h postelectroporation were used, and virus titers were determined by endpoint dilution assays on Huh-7 cells as described previously (58). Briefly, cell supernatants were serially diluted 10-fold in complete DMEM, and 50 μ l was used to infect 7×10^5 Huh-7 cells in 96-well plates. Infected cells were fixed at 48 h postinoculation and stained with anti-E1 antibody (A4). The viral titer is expressed as the number of focus-forming units (FFU) per milliliter of supernatant.

Intracellular infectivity. T25 flasks of electroporated cells were harvested at 72 h postelectroporation, washed with phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, and pelleted by centrifugation. Cell pellets were resuspended in 1 ml of DMEM containing 10% FBS and supplemented with nonessential amino acids and subjected to four freeze-thaw cycles (16). Cell debris was then removed by centrifugation, and supernatants were used to determine intracellular infectivity as described above.

Quantification of HCV RNA. Huh-7 cells, in 35-mm wells of six-well cell culture plates, were passaged at 72 h postelectroporation. Cells and supernatants were harvested at 72 h postpassage (i.e., 6 days postelectroporation [P1/6d]), and intra- and extracellular HCV RNA was titrated by quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) assay as described previously (10). One microgram of total RNA was used for intracellular HCV RNA quantification.

Quantification of HCV core protein. HCV core antigen (Ag) expressed within cells or secreted into the supernatant was quantified at P1/6d with an immunoassay using chemiluminescent microparticle technology (Architect HCV Ag Test; Abbott, France) (39). The concentration of HCV core Ag in the specimen was determined using a previously generated calibration curve. The cutoff value was set at 3.00 fmol/liter, equivalent to 0.06 pg/ml of recombinant c11 Ag (residues 1 to 160 of the HCV genotype 2a isolate [GenBank accession number I49748]). Specimens with concentration values of <3.00 fmol/liter were considered nonreactive for HCV Ag. For intracellular core protein quantification, cells were lysed in 450 μ l of PBS supplemented with 1% Triton-X, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 μ g/ml tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche) at 4°C for 20 to 30 min. Cleared lysates were then measured at a dilution of 1:500 in PBS. Supernatants were clarified by centrifugation prior to core protein quantification.

Velocity sedimentation and sucrose gradients. Electroporated cells of wt and mutant genomes were lysed at 72 h postelectroporation in lysis buffer containing 50 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.3% NP-40, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche) for 15 min at room temperature and then incubated on ice. Cell lysates were precleared by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min at 4°C. Each sample was then layered on top of 12 ml of a 10% to 60% sucrose gradient prepared in the same buffer without detergent and centrifuged in a Beckman SW41 Ti rotor (Beckman) at 29,000 rpm for 16 h at 4°C. Fractions of 1 ml were collected from the top of each tube. Proteins were precipitated by the methanol-chloroform method, resuspended in sample buffer, and then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Encapsidated RNA analysis. Cells were lysed at 72 h postelectroporation using the lysis buffer used above. The nucleocapsids were then pelleted over a 30% sucrose cushion in a Beckman TLA 55 rotor at 48,000 rpm for 5 h at 4°C. Pellets were resuspended in 50 μ l of Dulbecco's PBS (DPBS) overnight. Ten percent of each pellet was used for SDS-PAGE. The rest was divided into two parts: one part was treated with RNase and DNase to eliminate any nonincorporated and nonprotected nucleic acids by the nucleocapsid, and the other part remained untreated. RNAs were extracted by an RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and eluted in 30 μ l of RNase-free water. Five microliters was used for RNA quantification as described above.

Core trans-complementation. Huh-7w7 cells were electroporated with mutant or truncated (deletion of residues 62 to 160) core protein RNAs. At 72 h postelectroporation, cells were seeded onto 35-mm wells of six-well cell culture

plates and cultured overnight before transfection. Mutants and wt pcDNA/core protein plasmids or empty pcDNA3.1 (2 µg) were transfected into cells using TransIT-T1 reagent (Mirus). Supernatants of transfected cells were collected after a further 48-h period and titrated as described above.

Membrane protection assay. A membrane protection assay was performed as described previously by Ai et al. (1) to assess the core protein envelopment by cellular membranes. Briefly, electroporated cells were harvested at 72 h post-electroporation and resuspended in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM CaCl₂, and 1 mM dithiothreitol (DTT). Cells were passed 25 to 30 times through a 27-gauge syringe. After a centrifugation at 1,000 × g for 10 min at 4°C, the postnuclear supernatant was used in a protease protection assay with proteinase K (10 µg/ml) in the presence or absence of 1% Triton X-100 on ice for 1 h. The reaction was quenched by the addition of 5 mM PMSF (final concentration), followed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Western blot analysis. Western blot analysis was performed as described previously (11) with some modifications. Briefly, cells were lysed in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton-X, 0.5 mM PMSF, 50 µg/ml TPCK, and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche) at 4°C for 20 to 30 min. After a precleaning by centrifugation, protein concentration was determined in the postnuclear supernatants by the Bradford method (Bio-Rad). The proteins were then resolved by SDS-12.5% PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). Proteins of interest were revealed with specific primary antibodies, followed by species-specific secondary antibodies conjugated to peroxidase.

Indirect immunofluorescence microscopy. Immunofluorescent detection of viral proteins was performed as previously described (17, 47). Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. After being blocked with PBS-10% goat serum, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. Cells were washed with PBS and then incubated with secondary antibodies for 30 to 45 min at room temperature. In a last step, lipid droplets were stained with BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) 493/503 (0.5 µg/ml; Invitrogen) for 10 min at room temperature. Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Image acquisition was carried out using an Axiophot 2 microscope (Zeiss) equipped with a Coolsnap ES camera (Photometrix). For colocalization experiments, confocal microscopy was performed with an LSM710 confocal microscope (Zeiss) using a 63× oil immersion objective with a 1.4 numerical aperture. Signals were sequentially collected using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. Images were assembled using Adobe Photoshop software.

RESULTS

Two clusters rich in basic residues are located at the N terminus of HCV core protein. In recent reports (27, 40), the role of amino acids 57 to 191 of the HCV core protein has been investigated. In these two studies, many residues were shown to be essential during the viral life cycle. Nevertheless, the role of the N terminus of core protein in viral infectivity has not yet been studied. When analyzed in a cell-free system, this part of core protein seemed important for HCV nucleocapsid assembly (25, 26). This region contains many basic residues located between aa 1 to 62 of the core; however, their role in HCV infectivity has not yet been investigated. We therefore analyzed the basic residues located between aa 1 to 62 for their role in HCV infectivity. The N terminus of the core protein contains 18 basic residues (5 lysines and 13 arginines), and a RNA binding activity has also been described as being associated with this region (49). The basic residues can be grouped into two clusters (cluster 1, aa 6 to 23; cluster 2, aa 39 to 62). As shown in Fig. 1, five basic residues (K6, R9, K10, K12, and R13) are located in the first 14 aa of the core protein. In addition, 10 basic residues (R17, R18, K23, R39, R40, R43, R47, R50, K51, and R55) are found in a region of the core protein for which the RNA coding sequence is well structured in stem-loops V and VI (SLV and SLVI, respectively) (51).

The last three basic residues (R59, R61, and R62) are located outside these structures. The strategy used in this study was to replace basic residues with alanines to create mutants with double or triple mutations and to determine whether they affect the virus life cycle. The residues were then modified separately in mutants of interest to point out the most essential amino acids for HCV infectivity.

Substitution of the basic residues with alanines was performed by site-directed mutagenesis. Specifically, the first two nucleotides of each codon were modified, and the third nucleotide was unchanged. Mutations were created in the context of a modified JFH1 virus (JFH1/CS-N6-A4, considered here as the wt) (11, 17) to investigate viral production. To quantify RNA replication, the luciferase reporter mutant JFH1/NS5A-Gluc was generated from the JFH1 virus. In this mutant, the Gluc-coding sequence was introduced into the NS5A-coding sequence of JFH1 at a position where viral replication is still favored (38).

Modification of basic residues located in cluster 1 (aa 6 to 23). To study the function of the first cluster, basic residues were mutated to alanines, as mentioned above. In this way four mutants, K6A/R9A/K10A (K6R9K10), K12A/R13A (K12R13), R17A/R18A/K23A (R17R18K23), and a mutant with all eight mutations (RK/8A), were first generated (Fig. 1). Thus, replication fitness of the wt and mutants was determined in CD81-deficient Huh-7w7 cells (46) after electroporation of the *in vitro* transcribed RNAs. Viral replication and viral titers were analyzed, respectively, by quantification of luciferase activity and assay of the number of FFU in naïve Huh-7 cells. As shown in Fig. 2A, the replication levels of the K6R9K10 and R17R18K23 mutants were about 12- and 3-fold lower, respectively, than those obtained with the parental virus. The replication rate of the K12R13 mutant was comparable to that of the wt. As expected, no replication was observed with the polymerase-defective mutant (JFH1/NS5A-Gluc/GND). Furthermore, the RK/8A mutant showed a replication level comparable to that of the polymerase-defective mutant (GND). The titration of each virus produced in a single cycle of virus infection revealed that the titers of the K6R9K10 and R17R18K23 mutants were reduced 7-fold and 5-fold, respectively, while the titer of the K12R13 mutant was similar to that of the parental virus (Fig. 2B). As expected from its replication defect, the RK/8A mutant did not produce any detectable infectious viral particles, as observed for the control virus lacking envelope glycoproteins JFH1/ΔE1E2.

As the 5' core protein coding sequence is also involved in the IRES function (45), we hypothesized that modifications in this nucleotide sequence might affect the viral genome translation. The IRES-dependent expression of mutant core proteins was analyzed by an *in vitro* translation assay. Compared to expression of the wt core protein, only slight differences were observed for K6R9K10 and R17R18K23 core protein expression, suggesting that nucleotide modifications of these mutants had little impact on translation, whereas core protein expression was undetectable in the RK/8A mutant (Fig. 2C). Furthermore, bands that might correspond to dimeric and trimeric forms of the core protein were detected for all mutants, as observed previously (33), except RK/8A. However, a band with reduced mobility compared to that of the wt and other mutants was observed for this mutant. This band comigrated with a

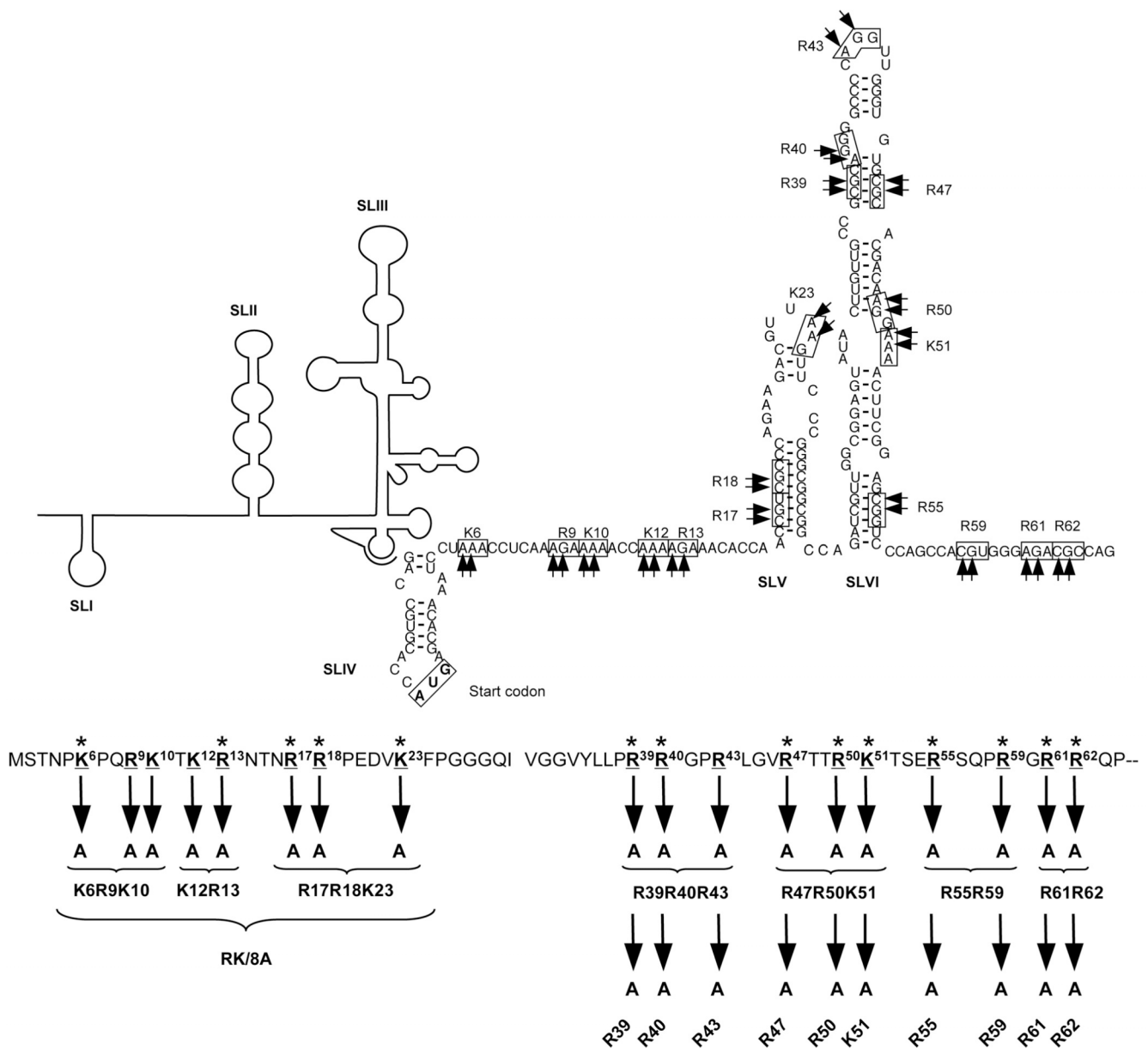


FIG. 1. Proposed model of secondary RNA structures of JFH1 within the 5' NTR and the 5' end of the capsid-coding sequence. The major structural domains are indicated by SL (stem-loop) followed by roman numerals. The authentic initiator AUG codon is highlighted in SLIV. The presence of SLV and SLVI has been suggested by Smith and Simmonds (51) and adapted to JFH1 based on the structure also presented by Vassilaki and collaborators (54). Mutated residues are indicated with arrows that point out the two nucleotides of each codon that were replaced with GC to obtain an alanine. The position of each basic residue and the different amino acid mutants that were initially modified are indicated by asterisks. Basic residues that are conserved with more than 99% of the listed sequences in the European HCV database (<http://euhcvdb.ibcp.fr>) are indicated by asterisks. The other residues are conserved in 95 to 99% of these sequences.

faint band observed with a translation control in the absence of RNA, suggesting that the band was not specific. The decreased level of RNA replication observed in the RK/8A mutant was therefore probably due to lower translation caused by nucleotide modifications introduced in the core protein sequence close to the IRES. Consequently, the combination of mutations interferes with infectivity by affecting the translation and/or the replication of the viral genome. Taken together, our data indicate that basic residues of this cluster (aa 6 to 23) have

no major role in HCV infectivity when they are modified separately.

Modification of basic residues located in cluster 2 (aa 39 to 62). Four mutants were created with modifications in the second basic cluster (aa 39 to 62). Two of them are located in stem-loop VI, R39A/R40A/R43A and R47A/R50A/K51A (R39R40R43 and R47R50K51, respectively), and the other two, R55A/R59A and R61A/R62A (R55R59 and R61R62, respectively), are outside this structure (Fig. 1). As shown in

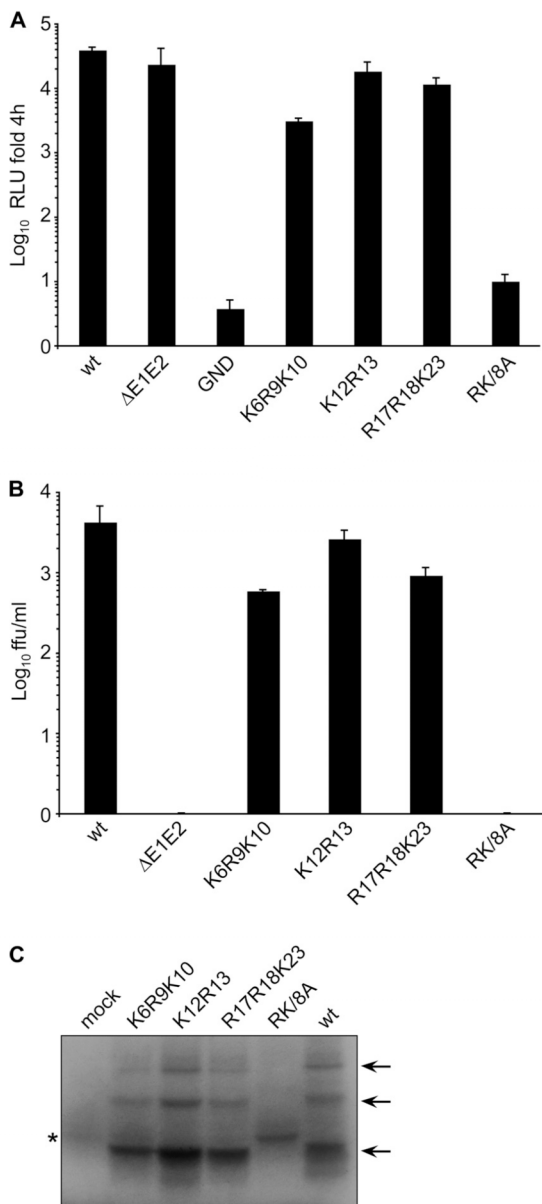


FIG. 2. Replication and infectivity of core mutants generated in the first basic cluster. (A) Replication of core protein mutants was measured by *Gaussia* luciferase activity at 72 h postelectroporation. Values are expressed relative to the quantity of luciferase activity measured at 4 h postelectroporation. (B) Determination of infectious virus production released from transfected cells. Supernatants were harvested at 72 h postelectroporation and were assayed by endpoint dilution assays of FFU using naïve Huh-7 cells. Means and standard errors of the means of results from at least duplicate electroporations are shown. (C) T7 RNA transcripts were obtained from plasmids containing the HCV IRES and core protein-coding sequences of the first cluster mutants. Transcripts were then translated for 1 h in a rabbit reticulocyte lysate with addition of [³⁵S]methionine in the reaction mixture. Arrows indicate monomeric, dimeric, and trimeric forms of the core protein. The nonspecific band is indicated by an asterisk. RLU, relative light units.

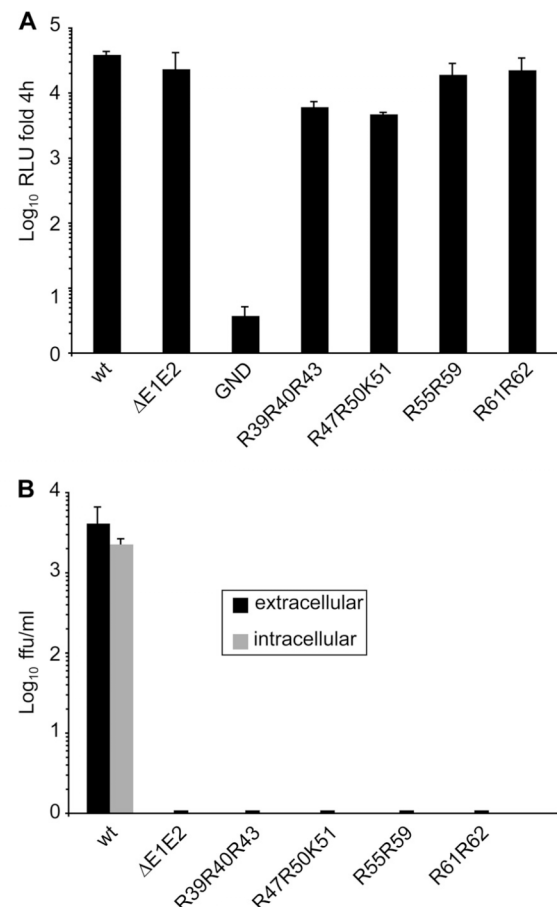


FIG. 3. Replication and infectivity of core protein mutants generated in the second basic cluster. (A) Replication of core protein mutants and normalization of values were performed as described in the legend of Fig. 2. (B) Determination of intracellular and extracellular infectious virus produced from electroporated cells at 72 h postelectroporation. Means and standard errors of the means of results from at least duplicate electroporations are shown. (C) Western blot analysis of lysates harvested at 72 h postelectroporation. Results for core protein, E2, NS5A, and actin are indicated.

Fig. 3A, all mutants were able to replicate the viral genome. R55R59 and R61R62 mutants, whose modifications were introduced outside the SLVI, were able to replicate the viral genome as efficiently as the wt at 72 h postelectroporation.

However, replication levels of R39R40R43 and R47R50K51, whose mutations were introduced into the SLVI, were about 6- and 8-fold lower, respectively, than the level of the wt. Mutations introduced into SLVI were predicted to disturb the upper

or the middle half of the stem-loop (Fig. 1). These data suggest that the combination of mutations in SLVI could impact viral replication. Similar effects on HCV replication induced by SLVI destabilization have been described by Vassilaki and collaborators (54). Importantly, none of our mutants was able to produce infectious viral particles when tested with the inoculation of naïve Huh-7 cells with the supernatant of the different electroporated cells (Fig. 3B). As shown in Fig. 3C, core protein was detectable in all the mutants at 72 h postelectroporation, with decreased expression levels in the R39R40R43 and R47R50K51 mutants. The decreased replication levels of these two mutants might explain these differences in core protein expression. Together, these data suggest that the inability to produce infectious virus does not result from the instability of mutant core proteins.

Since the release of infectious particles could be altered by these changes, we next investigated the intracellular production of viral particles. Electroporated cells were washed and lysed at 72 h postelectroporation by multiple freeze-thaw cycles, as described previously (16). Clarified lysates were then used to infect naïve Huh-7 cells. In contrast to the wt, none of these lysates was able to infect new cells, indicating that no intracellular infectious virus was produced by these mutants (Fig. 3B). Altogether, these data suggest that one or more of the basic residues located in each mutant of the second cluster are necessary for HCV infectivity.

Identification of basic residues necessary for HCV infectivity. In an attempt to identify basic residues of the core protein necessary for infectious virus production, we separately mutated each basic residue to alanine in the second cluster (aa 39 to 62) as indicated in Fig. 1. For most single mutants, the replication rates were comparable to the rate of the wt. However, slightly lower levels were observed for R39 and R47 mutants (Fig. 4A). The values were comparable to those obtained with the R39R40R43 and R47R50K51 mutants, suggesting that modifications of nucleotides (nt) 455 to 456 (mutant R39) or 479 to 480 (mutant R47) in the SLVI affected RNA replication. Since these two mutations disrupted two base pairings in the SLVI structure (Fig. 1), our data further support the role of this portion of the stem-loop structure in HCV replication.

We next investigated the effect of our single mutations on the production of infectious viral particles. As shown in Fig. 4B, only four of these mutants were unable to produce infectious viral particles. Indeed, only the R50, K51, R59, and R62 mutants were unable to infect naïve cells. The infectivity of the R39, R40, R43, and R47 mutants was about 5- to 8-fold lower than that of the wt, whereas R55 and R61 infectivity was comparable to that of the wt. Interestingly, in contrast to the R39R40R43 mutant, which was not infectious, the single mutants R39, R40, and R43 were still infectious. This might be explained by the cumulative effect of these mutations. The absence of infectivity for the R50, K51, R59, and R62 mutants was not due to the instability of mutant core proteins since the proteins were detected at 72 h postelectroporation by Western blotting (Fig. 4C). Furthermore, intracellular infectivity of these defective mutants was tested as described above. However, no infectivity was detected after naïve cells were inoculated with clarified ly-

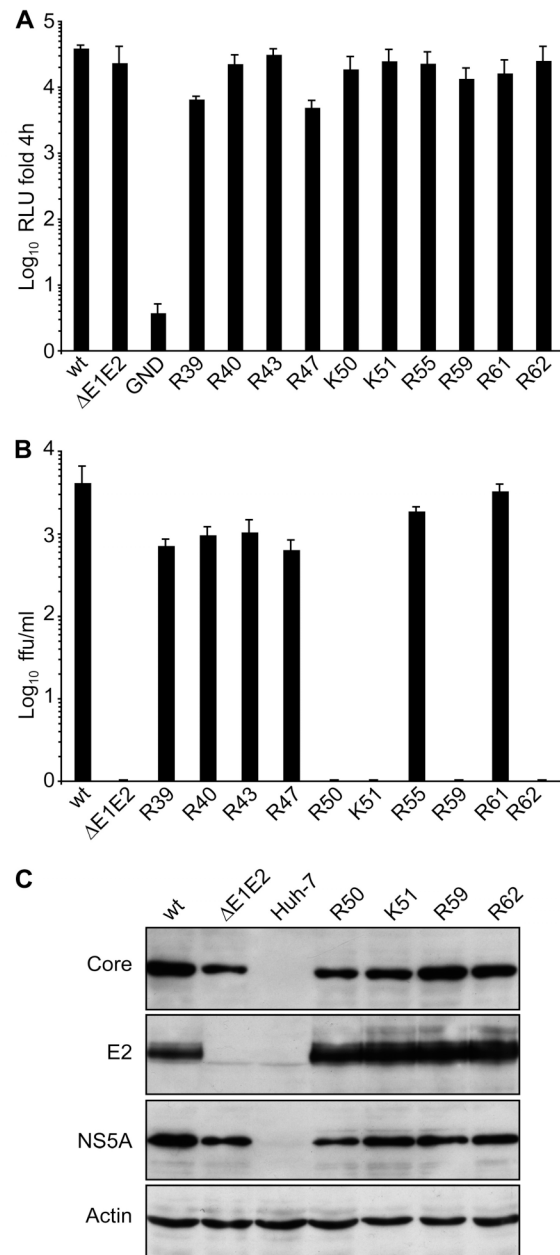


FIG. 4. Analysis of individual core protein mutants of the second cluster. (A) Replication of core protein mutants and normalization of values were performed as described in the legend of Fig. 2. (B) Determination of infectious virus production released from electroporated cells at 72 h postelectroporation. Means and standard errors of the means of results from at least duplicate electroporations are shown. (C) Western blot analysis of lysates harvested at 72 h postelectroporation. Results for core protein, E2, NS5A, and actin are indicated.

sates obtained at 72 h postelectroporation of cells with mutant RNAs (data not shown). Together, these data suggest that the R50, K51, R59, and R62 residues are critical for the production of infectious viral particles. Given their importance, all further experiments were performed only on these four mutants.

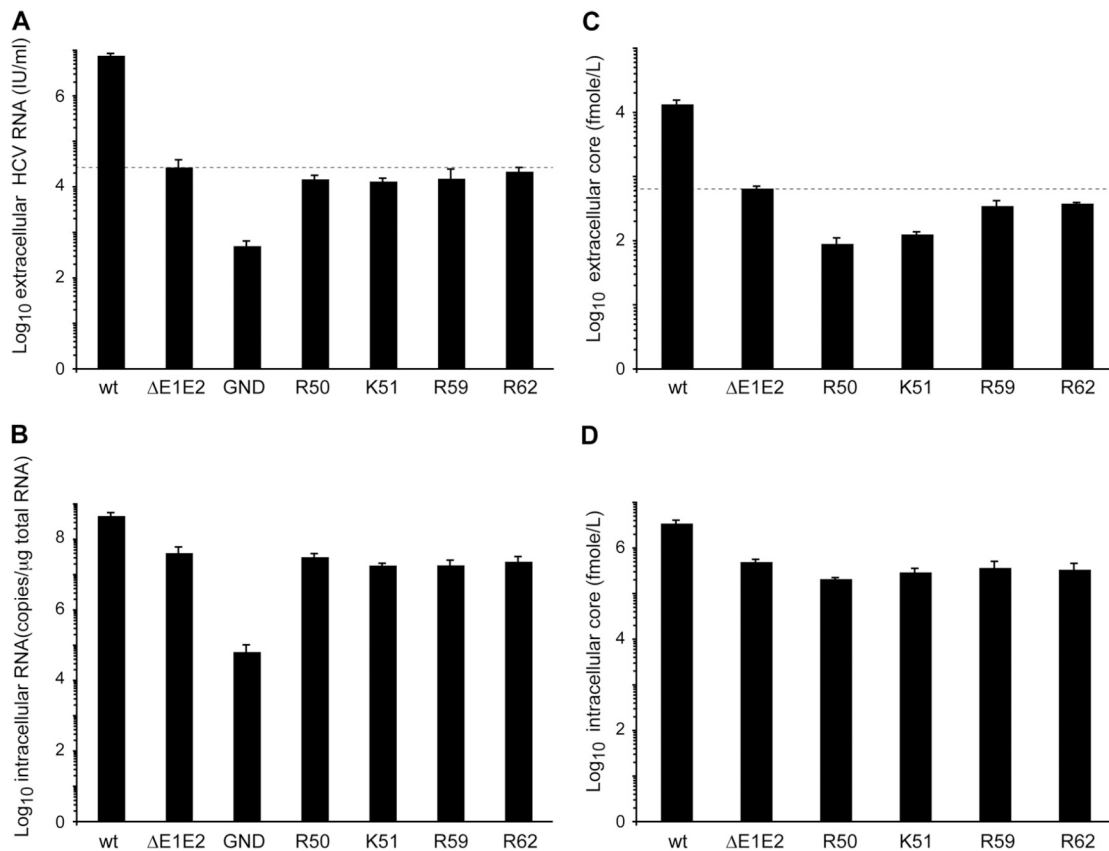


FIG. 5. Defective core mutants do not release viral particles. (A and B) Cells were electroporated with the wt and core protein mutant RNAs. At 72 h postelectroporation, cells were passaged, and extra- and intracellular viral RNA was quantified after a further 72 h (i.e., 6 days postelectroporation [P1/6d]) as described in Materials and Methods. (C and D) Quantification of extra- and intracellular HCV core protein of electroporated cells at P1/6d. Dashed horizontal lines indicate background levels based on those of negative controls. Means and standard errors of the means of results from at least duplicate electroporations are shown.

No release of noninfectious particles by core mutants. The lack of intra- and extracellular infectivity of our mutants might result from a defect in particle assembly or from some alteration during the disassembly process in HCV entry. To discriminate between these two hypotheses, we investigated if noninfectious particles were produced by analyzing the release of HCV RNA and core protein into the supernatants. The HCV RNA in cell culture medium was quantified after one passage to avoid any contamination by the RNA used for electroporation. RNA levels released by noninfectious R50, K51, R59, and R62 mutants were about 2 to 3 logs lower than the level of the wt and were similar to the RNA level released from the assembly-defective JFH1/ΔE1E2 control (Fig. 5A). In addition, none of these mutants released larger amounts of core protein than JFH1/ΔE1E2, and these amounts were about 20- to 150-fold lower than the amount released by the wt (Fig. 5C). The reduced levels of secreted RNA and core protein were not due to diminished accumulation in electroporated cells since the intracellular levels of RNA and core protein of mutants were comparable to those of the wt (Fig. 5B and D). Taken together, these data indicate that these mutants do not release noninfectious particles and that the defect in viral particle production probably occurs at the assembly step.

Intracellular localization of core protein. As previously described, core protein localizes to the lipid droplets (LDs) (6, 34), which have been defined as important organelles for HCV assembly (36). We therefore analyzed the subcellular localization of the mutant core proteins to determine the effect of these mutations on the association with the LDs. As shown in Fig. 6A, all core mutants colocalized with the LDs in a manner indistinguishable from that of the wt. Moreover, as recent data indicated that NS5A also plays a key role in the HCV particle formation by interacting with the core protein (32), colocalization of NS5A with our mutant core proteins was also investigated. A partial colocalization of core protein and NS5A was observed in the perinuclear area of electroporated cells (Fig. 6B). However, no alteration in the subcellular localization of these two proteins was observed in the mutants (Fig. 6B). Together, our data suggest that these mutations do not disturb the subcellular localization of the core protein with LDs and NS5A protein.

Core protein trans-complementation. Since mutations introduced in the core protein-coding sequence also lead to modification of RNA nucleotide sequence, we wanted to determine whether the effects observed with the mutants were due to amino acid or to RNA nucleotide changes. For this purpose, a

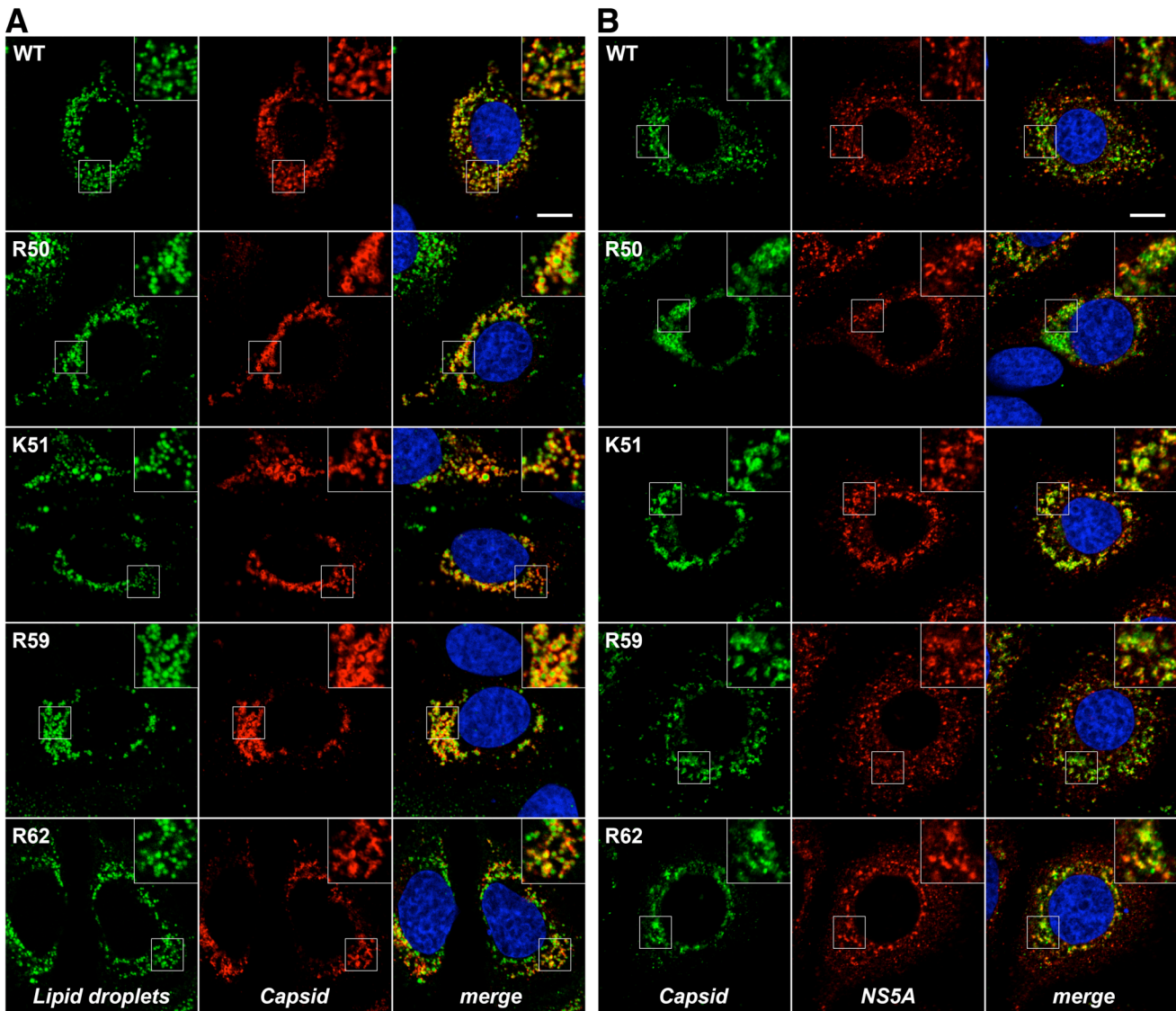


FIG. 6. Subcellular localization of core protein. (A) Huh-7 cells were electroporated with *in vitro* transcribed HCV genomes containing the indicated mutations. Cells were fixed at 72 h postelectroporation, and core protein was detected with MAb anti-core 2H9 (red). Lipid droplets were stained with BODIPY 493/503 (green). (B) Fixed cells at 72 h postelectroporation were double labeled with MAb anti-core (2H9/IgG1) (green) and MAb anti-NS5A (9E10/IgG2a) (red). For both panels, merged images and zoomed views of the indicated areas are shown. Nuclei were stained with DAPI (blue). Representative confocal images are shown. Bar, 10 μ m.

trans-complementation assay was developed. A JFH1/ Δ core (62–160) RNA, expressing a truncated HCV core protein, was introduced by electroporation into Huh-7w7 cells, and the cells were passaged 72 h later. Then, these cells were transfected with plasmids expressing the wt or mutant core proteins. Supernatants harvested at 48 h posttransfection were used to infect naïve Huh-7 cells for 48 h. As shown in Fig. 7A, other than the wt core protein-expressing plasmid, no mutant core protein could rescue the core protein-truncated mutant, in spite of successful expression of core protein (Fig. 7B). In contrast, when cells were electroporated with defective mutant genomes followed by transfection with the wt core protein-expressing plasmid, all supernatants were infectious (Fig. 7C). These data indicate that these mutations were rescued by the

wt core protein. As shown in Fig. 7D, infected cells with *trans*-complemented JFH1/ Δ core (62–160) supernatant were positive for NS5A protein but negative for core protein, as observed in immunofluorescence studies. Moreover, the supernatants of *trans*-complemented mutants were able to initiate only a single round of infection (data not shown). These results indicate that the observed infectivity was due to the *trans*-complementation, and not to the recombination, between mutant RNAs and core protein transcripts. Together, our results indicate that the loss of infectivity observed for R50, K51, R59, and R62 mutants is due to the mutation of basic residues rather than to RNA sequence changes.

Analysis of core protein oligomerization and RNA encapsidation. To further understand the molecular basis of the ab-

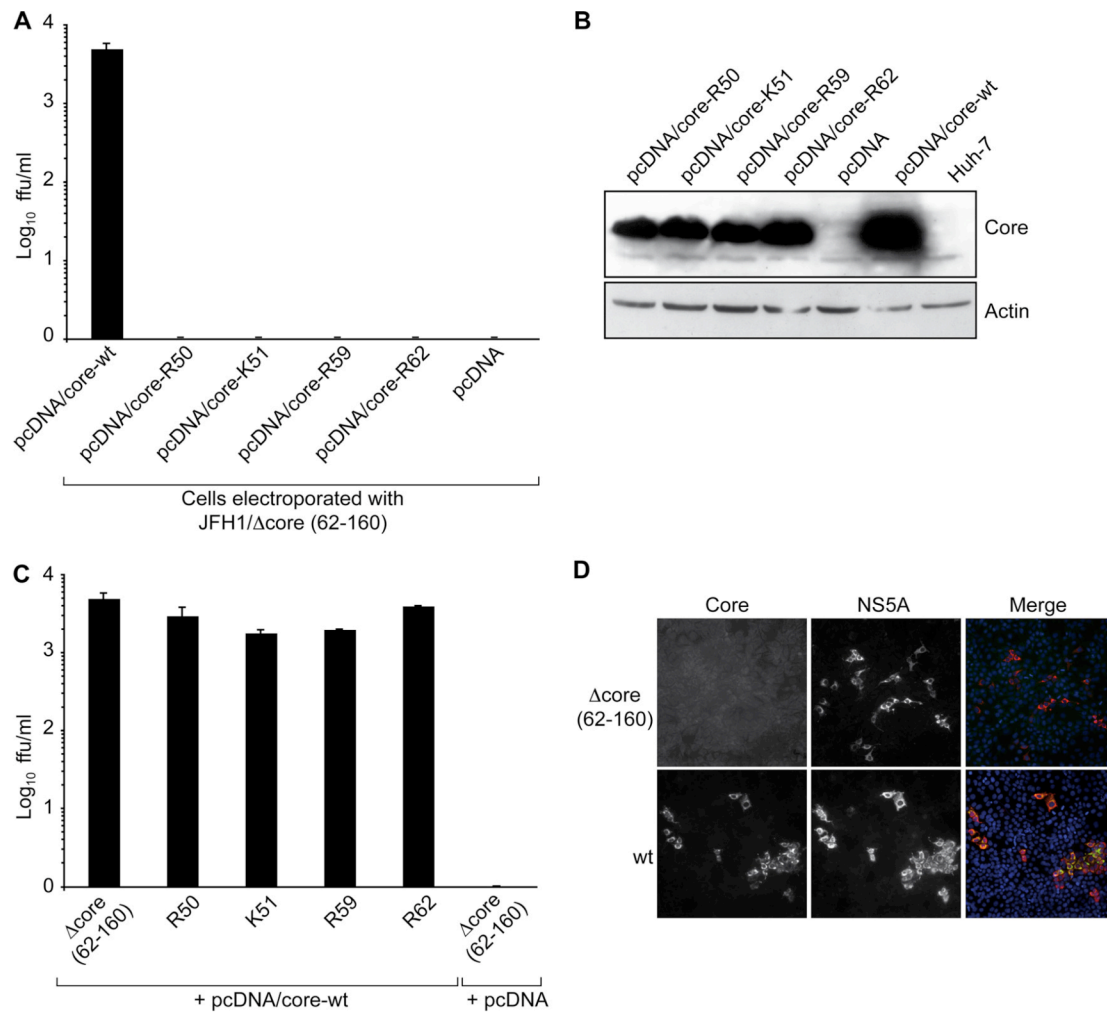


FIG. 7. *trans*-complementation assays. (A) Huh-7w7 cells were electroporated with a core protein deletion mutant, JFH1/Δcore (62–160). At 72 h postelectroporation, cells were seeded onto 35-mm wells of a six-well cell culture plate and cultured overnight. Cells were transfected with empty pcDNA3.1 or with plasmids expressing the wt or mutant core proteins. Infectious virus production was assayed at 48 h posttransfection as described in Materials and Methods. (B) Western blot analysis of electroporated cells at 48 h posttransfection. Results for core protein and actin are shown as controls of transfection. (C) Electroporated Huh-7w7 cells with mutant genomes were passaged at 72 h postelectroporation as in panel A. Cells were then transfected with the pcDNA/core-wt plasmid, and infectivity was titrated at 48 h posttransfection as described in Materials and Methods. An empty pcDNA plasmid was used as a negative control. Means and standard errors of the means of results from at least duplicate electroporations are shown. (D) Supernatant of JFH1/Δcore (62–160)-electroporated Huh-7w7 cells that were *trans*-complemented with wt core protein was used to infect naïve Huh-7 cells. Cells were fixed at 48 h postinoculation, and immunostaining was performed with anti-core protein and anti-NS5A antibodies (upper panel). Supernatant of wt-electroporated Huh-7w7 cells was used as a control (lower panel).

sense of intracellular and extracellular infectious virus particles, we investigated whether the core protein was able to oligomerize into nucleocapsid structures. Oligomerization of core proteins expressed by these mutants was analyzed on a sucrose gradient by ultracentrifugation, as described in Materials and Methods. The core protein complexes of the wt were detected in all the fractions (Fig. 8A), with a peak of intensity in fractions 6 to 8, as described previously (1). The first fractions likely correspond to monomeric forms of core proteins, whereas the other fractions must correspond to highly ordered multimeric complexes. A similar profile of sedimentation was observed with the assembly-defective control JFH1/ΔE1E2 (Fig. 8B). In contrast, when the wt core protein was treated

with 1% SDS before ultracentrifugation, only the monomeric form of the core protein was detected in fractions 1 and 2 at the top of the gradient. This profile is due to the disruption of core protein complexes by SDS, as observed by Ai and collaborators (1) (Fig. 8B). Although the core protein of the mutants also showed a peak of sedimentation in fractions 6 to 8, some slight differences could be observed (Fig. 8A). In the case of R50, a sharp peak was observed in fraction 7 only, whereas the core protein peaked more toward the bottom of the gradient for the K51 and R59 mutants. Despite these differences, it appeared that the core proteins of all noninfectious mutants were able to assemble into nucleocapsid-like structures, just like the wt core protein (Fig. 8A). These results therefore suggest that the

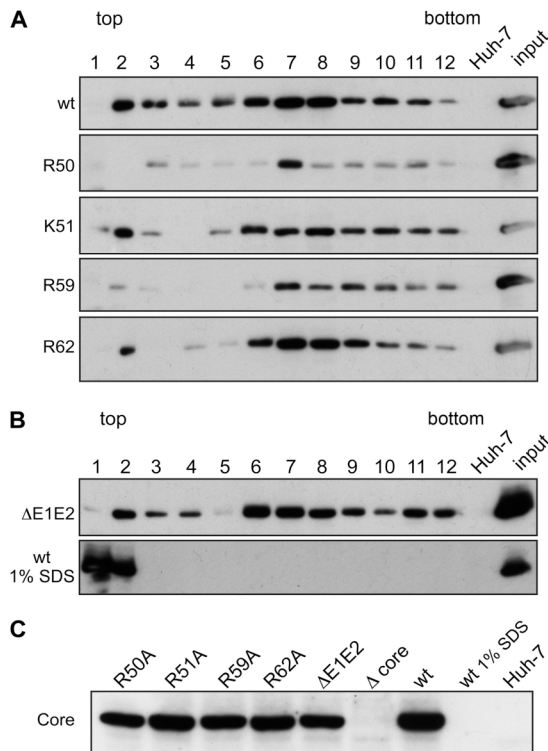


FIG. 8. Characterization of mutant core protein oligomerization by velocity sedimentation. (A) Cells electroporated with mutant and wt RNA genomes were lysed at 72 h postelectroporation as described in Materials and Methods. Lysates were subjected to 10 to 60% sucrose density gradient centrifugation, followed by Western blot analysis of core protein. (B) Sucrose density gradient (10 to 60%) centrifugation from cells electroporated with JFH1/ΔE1E2 genome (upper panel) and lysate of wt electroporated cells pretreated with 1% SDS (lower panel), followed by Western blot analysis of core protein. The input represents 10% of lysates. (C) Nucleocapsids were isolated as described in Materials and Methods, and 10% was resolved on 12.5% SDS-PAGE followed by Western blot analysis of core protein.

mutations do not affect core protein multimerization. However, the differences observed in the sedimentation profiles of the mutants suggest that there might be differences in the compactness of the nucleocapsid-like structures of the mutants.

To determine whether the viral genome could be encapsidated by the mutants, we quantified the viral RNA associated with the isolated nucleocapsid by quantitative RT-PCR. For this, nucleocapsids were isolated on a cushion of 30% sucrose, as reported for virus-like particles (4) and hepatitis B virus (HBV) nucleocapsid (5, 28). Ten percent of the resulting pellets were analyzed by Western blotting, and the rest were divided into two parts. One part remained untreated, whereas the other part was treated by RNase A and DNase to eliminate any nucleic acids and RNA that were not incorporated and protected by the nucleocapsid. As shown in Fig. 8C, core protein was detectable in the pellet for all mutants, indicating the presence of core protein. As a control, no detection of core was observed with a core deletion mutant, Δcore (62-160), and wt lysate pretreated with 1% SDS. As shown in Table 1, a 182-fold decrease was observed for wt RNA after treatment with RNase, whereas it was 16,129-fold lower when the lysate was treated with 1% SDS before ultracentrifugation and RNase treatment. These results indicate that the difference in RNA detection between treated and untreated samples was due to RNA protection by an SDS-sensitive factor, most likely the capsid. As shown in Table 1, all core mutants were able to protect viral RNA from RNase treatment as efficiently as the wt core protein. Altogether, these data suggest that core mutations do not inhibit core protein-RNA interaction and RNA encapsidation.

Assessment of core protein envelopment by membrane protection assay. Recently, Ai and coworkers have characterized the HCV core protein interaction with intracellular membranes and core protein envelopment (1). In this study core protein envelopment seems to play a role in the early phase of HCV maturation and morphogenesis (1). To further understand the mechanism by which the mutated basic amino acid residues of the second cluster (R50, K51, R59, and R62) inhibited HCV infectivity, we characterized their effect on core protein envelopment by a membrane protection assay (1). As shown in Fig. 9, comparable levels of core protein from wt and mutants were still resistant to proteolysis by proteinase K in the absence of detergent, which decreased dramatically when postnuclear fractions were treated with detergent and proteinase K. Together, our results suggest that mutating amino acids R50, K51, R59, and R62 to alanines does not interfere with core protein envelopment by intracellular membranes.

TABLE 1. RNA encapsidation and protection by the nucleocapsids^a

Mutant	Mean no. of viral RNA copies/5 μl of isolated RNA		Relative RNA quantification	
	Untreated	Treated	No. of copies in untreated NC/no. in treated NC	No. of copies in treated NC/no. in untreated NC (% of wt)
wt	8.94 × 10 ⁷	4.92 × 10 ⁵	182	5.5 × 10 ⁻³ (100)
wt-SDS ^b	6.87 × 10 ⁷	4.26 × 10 ³	16,129	6.2 × 10 ⁻⁵ (1)
R50 mutant	2.52 × 10 ⁷	1.32 × 10 ⁵	192	5.22 × 10 ⁻³ (95)
K51 mutant	3.47 × 10 ⁷	1.66 × 10 ⁵	209	4.78 × 10 ⁻³ (87)
R59 mutant	3.25 × 10 ⁷	3.45 × 10 ⁵	94	1.06 × 10 ⁻² (193)
R62 mutant	7.25 × 10 ⁷	4.33 × 10 ⁵	167	5.98 × 10 ⁻³ (109)
JFH1/ΔE1E2	5.38 × 10 ⁷	1.36 × 10 ⁵	396	2.52 × 10 ⁻³ (46)

^a Core protein-associated RNAs were quantified by qRT-PCR, and the ratios in untreated NC/NC treated with RNase A and DNase and in treated NC/untreated NC were calculated. Ratios of values in treated/untreated NC were compared to the wt ratio, and results are expressed as a percentage of the wt, which was set to 100%. This method enabled us to minimize the differences linked to electroporation efficiency and manipulation. Means of the results from duplicate electroporations are shown.

^b SDS, lysate pretreated with 1% SDS.

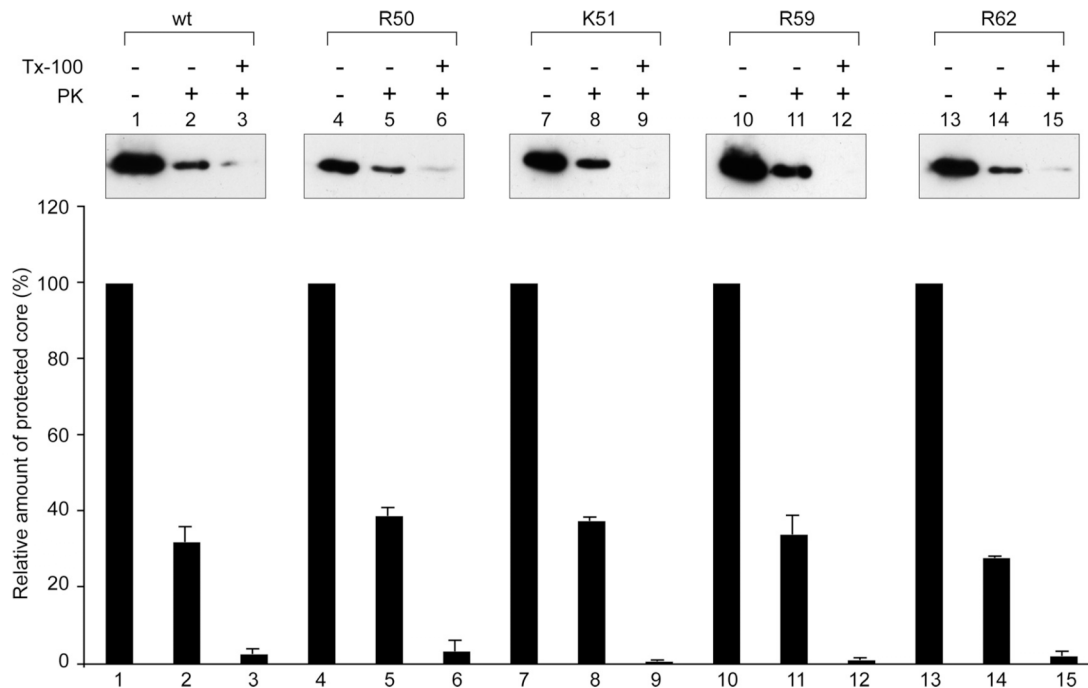


FIG. 9. Assessment of core protein envelopment by membrane protection assay. Electroporated cells were harvested at 72 h postelectroporation, and a membrane protection assay was performed as described in Materials and Methods. Postnuclear fractions were treated with 10 μ g/ml proteinase K (PK) in the presence or absence of Triton X-100 (Tx-100) on ice for 1 h (top panel). The density of bands corresponding to the core proteins in each treatment was scanned and quantified. The percentages of core protein levels detected in samples treated with PK alone or with Triton X-100 and PK relative to the untreated sample were determined. A representative graph of experiments from duplicate electroporations with means and standard errors of the means is shown (bottom panel).

DISCUSSION

In the present study we analyzed a series of basic residues at the N terminus of the HCV core protein to determine their potential involvement in HCV infectivity in the context of the HCVcc system (55). Importantly, we identified four basic amino acid residues, R50, K51, R59, and R62, which are essential for the assembly of infectious viral particles. These residues are highly conserved in the HCV core protein (Fig. 1).

As reported previously (9), the N terminus of HCV core protein contains two highly conserved clusters of basic amino acid residues. These two clusters (aa 6 to 23 and 39 to 62) are separated by a neutral linker region. Moreover, the RNA sequence coding the first 62 residues of the core protein has been reported to contain highly conserved structures in the form of two stem-loops: SLV and SLVI (51). These structures are important for RNA translation/replication (35, 54). Among the modifications introduced into the first basic cluster of the core protein, only the R17R18K23 mutant was concerned with the SLV structure. Nucleotide substitutions introduced into SLV decreased replication by about 3-fold and reduced infectious titer by about 5-fold. Indeed, disruption of SLV has been previously reported to reduce viral replication and infectious titer of HCV (54), which can result from disruption of RNA-RNA or RNA-protein interactions.

In the first cluster of basic residues, mutants K6R9K10 and K12R13 did not disrupt SLV structure. The K6R9K10

mutant decreased viral replication by about 12-fold and the infectivity titer by about 7-fold, whereas the K12R13 mutant had replication and infectivity levels comparable to those of the wt. The data obtained from these three mutants suggest that the reduced infectivity could be due to the decreased levels of translation/replication. Moreover, a larger modification of basic residues as generated in the RK/8A mutant leads to a strict translation inhibition and to an unviable mutant. While most IRES sequences require only the 5' NTR, the HCV IRES seems to be dependent on a sequence downstream of the initiating AUG codon (45, 56). Furthermore, a cellular RNA-binding protein has been identified that modulates HCV translation by interacting with the core protein-coding sequence. Indeed, modification of the NSAP1-binding site, which is composed of an adenosine-rich region, has been shown to reduce the HCV IRES activity in an *in vitro* translation assay (24). Replacing the basic residues with alanines led to modifications of the first two nucleotides of each codon in the RK/8A mutant, which changed several adenosines to cytosine and guanine. This probably prevents NSAP1 interaction with RNA and consequently reduces its translation. *In cellulo*, the lower viral replication and production result consequently from a lower level of translation. Altogether, our data suggest that no specific residues or motifs affecting virus infectivity are present in the first basic cluster of core protein.

Some mutations of basic amino acid residues of the second cluster extend their nucleotide modifications to the

SLVI RNA structure. The R39R40R43 and R47R50K51 mutants, which disrupt the upper and middle parts of SLVI, led to a decrease in replication by about 6- to 8-fold compared to the wt. R55R59 and R61R62 mutants had replication levels comparable to the level of the wt although R55 disrupted the lower part of SLVI. This is in agreement with previous reports (35). However, despite stable core protein expression, these mutants produced neither intracellular nor extracellular infectious particles. Among the single mutants, only the R39 and R47 mutants decreased replication levels by about 6- to 8-fold, and these levels are comparable to those of the R39R40R43 and R47R50K51 mutants, respectively. Interestingly, in the predicted structure of SLVI, these modifications affect pairing bases at the same positions but in opposite strands (Fig. 1). Altogether, our data indicate that only modifications in this part of SLVI affect RNA replication. The remaining mutants had replication levels comparable to the level of the wt.

Analyses of single mutants generated with mutations in the second cluster revealed that 6 out of 10 mutants (R39, R40, R43, R47, R55, and R61) were infectious with some attenuation. In contrast, the infectivity of the R50, K51, R59, and R62 mutants was abolished. No infectious viral particles were detected intracellularly or extracellularly. Our data suggest that the absence of infectious viral particles is not due to the instability of the core protein since this protein was detected at 72 h postelectroporation. In a study by Murray and coworkers, alanine scanning mutagenesis of HCV core protein revealed numerous residues essential for the production of infectious virus (40). Mutants of J6/JFH1 with quadruple alanine substitutions in the core protein (C57/60A and C61/64A) could not be rescued by compensatory mutations located in the viral genome (40). These mutants contained the basic residues R59 and R62, which were characterized in our study as crucial for HCV infectivity. In addition, as reported previously, amino acid insertions between aa 23 to 107 of the core protein were lethal (2). Furthermore, these mutations did not disrupt the subcellular colocalization of the core protein with the LDs and NS5A protein, which have been reported to be essential for virus production (7, 32, 36). Moreover, viral infectivity of a deleted core mutant, Δ core (62-160) could not be rescued by *trans*-complementation with any of the four mutant core proteins. In contrast, the wt core protein could rescue these mutants, indicating that the effect is due only to amino acid changes and not to a change of nucleotides, which would be involved in RNA encapsidation.

Compared to the wt, analysis by sucrose gradient ultracentrifugation showed that all mutants were able to assemble into intermediate multimeric complexes, which might correspond to nucleocapsid-like structures. Previously reported data suggest that a deletion of 10 basic residues in cluster 2 reduces the ability of the capsid to assemble efficiently (25). Furthermore, when the number of mutated basic residues was increased, a progressive decrease in the ability of core protein assembly was observed (25). In our study, individual core mutations did not interfere with core assembly and multimerization. Moreover, all mutant nucleocapsids were able to protect the viral genome from the RNase treatment to a similar extent as the wt nucleocapsid,

suggesting that core-RNA interactions were not altered. Therefore, this suggests that these mutations inhibit viral assembly at a stage downstream of the oligomerization of the core protein and the encapsidation of RNA. A recent report (1) reveals that a cascade of core protein-membrane interactions is important in HCV morphogenesis. A deletion of aa 42 to 68 of the core protein, which contains the four residues identified in our study, decreased its envelopment by cellular membranes (1). In our study, when core protein envelopment was assessed by a membrane protection assay, mutated core proteins were protected by membranes to a similar extent as the wt core protein, suggesting that these residues do not alter core protein envelopment by intracellular membranes.

In conclusion, a comprehensive mutagenesis study of basic amino acid residues located at the N terminus of HCV core protein allowed the identification of four amino acids, R50, K51, R59 and R62, that are essential for HCV morphogenesis. None of these amino acids affects core protein colocalization with NS5A and LDs, RNA encapsidation, core protein oligomerization, or envelopment by intracellular membranes. Understanding the detailed mechanism by which these mutations can modulate infectious virus production will help broaden our knowledge of viral particle assembly and further the identification of new potential therapeutic targets.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laurence Cocquerel and Philip Meuleman for critically reading the manuscript and Sophana Ung for the preparation of the figures. Some data were generated with the Imaging Core Facility of the Calmette campus (MICPaL). We thank Steve S. L. Chen (Graduate Institute of Life Sciences, Taipei, Taiwan) for his advice in the membrane protection assay.

This work was supported in part by a grant from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) to Y.R. P.-Y.D. was supported by a predoctoral fellowship from MRT. K.A. was supported by a Syrian predoctoral fellowship. J.D. is an international scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

1. Ai, L. S., Y. W. Lee, and S. S. Chen. 2009. Characterization of hepatitis C virus core protein multimerization and membrane envelopment: revelation of a cascade of core-membrane interactions. *J. Virol.* **83**:9923–9939.
2. Arumugaswami, V., R. Remenyi, V. Kanagavel, E. Y. Sue, T. Ngoc Ho, C. Liu, V. Fontanes, A. Dasgupta, and R. Sun. 2008. High-resolution functional profiling of hepatitis C virus genome. *PLoS Pathog.* **4**:e1000182.
3. Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:1200–1205.
4. Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong, and T. J. Liang. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J. Virol.* **72**:3827–3836.
5. Baumert, T. F., S. A. Rogers, K. Hasegawa, and T. J. Liang. 1996. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J. Clin. Invest.* **98**:2268–2276.
6. Boulant, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratniner, P. Targett-Adams, J. P. Laverne, F. Penin, and J. McLauchlan. 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* **281**:22236–22247.
7. Boulant, S., P. Targett-Adams, and J. McLauchlan. 2007. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* **88**:2204–2213.
8. Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, and J. P. Laverne. 2005. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J. Virol.* **79**:11353–11365.
9. Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1994. Sequence analysis of the core

- gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:8239–8243.
10. Castelain, S., V. Descamps, V. Thibault, C. Francois, D. Bonte, V. Morel, J. Izopet, D. Capron, P. Zawadzki, and G. Duverlie. 2004. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *J. Clin. Virol.* **31**:227–234.
 11. Delgrange, D., A. Pillez, S. Castelain, L. Cocquerel, Y. Rouille, J. Dubuisson, T. Wakita, G. Duverlie, and C. Wychowski. 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* **88**:2495–2503.
 12. Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* **68**:6147–6160.
 13. Fan, Z., Q. R. Yang, J. S. Twu, and A. H. Sherker. 1999. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *J. Med. Virol.* **59**:131–134.
 14. Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating. 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virol.* **73**:6235–6244.
 15. Fromentin, R., N. Majeau, M. E. Laliberte Gagne, A. Boivin, J. B. Duvignaud, and D. Leclerc. 2007. A method for in vitro assembly of hepatitis C virus core protein and for screening of inhibitors. *Anal. Biochem.* **366**:37–45.
 16. Gastaminza, P., S. B. Kapadia, and F. V. Chisari. 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J. Virol.* **80**:11074–11081.
 17. Goueslain, L., K. Alsaleh, P. Horellou, P. Roingard, V. Descamps, G. Duverlie, Y. Ciczora, C. Wychowski, J. Dubuisson, and Y. Rouille. 2010. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **84**:773–787.
 18. Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* **67**:1385–1395.
 19. Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris, and D. J. Rowlands. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, amantadine. *FEBS Lett.* **535**:34–38.
 20. Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno. 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:5547–5551.
 21. Houghton, M. 1996. Hepatitis C viruses, p. 1035–1058. *In* D. M. Knipe, B. Roizman, P. M. Howley, T. P. Monath, S. E. Straus, R. M. Chanock, J. L. Melnick, and B. N. Fields (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
 22. Hussy, P., H. Langen, J. Mous, and H. Jacobsen. 1996. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* **224**:93–104.
 23. Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita. 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**:1808–18017.
 24. Kim, J. H., K. Y. Paek, S. H. Ha, S. Cho, K. Choi, C. S. Kim, S. H. Ryu, and S. K. Jang. 2004. A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol. Cell. Biol.* **24**:7878–7890.
 25. Klein, K. C., S. R. Dellos, and J. R. Lingappa. 2005. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *J. Virol.* **79**:6814–6826.
 26. Klein, K. C., S. J. Polyak, and J. R. Lingappa. 2004. Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J. Virol.* **78**:9257–9269.
 27. Kopp, M., C. L. Murray, C. T. Jones, and C. M. Rice. 2010. Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **84**:1666–1673.
 28. Koschel, M., D. Oed, T. Gerelsaikhan, R. Thomssen, and V. Bruss. 2000. Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J. Virol.* **74**:1–7.
 29. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.
 30. Major, M. E., B. Rehermann, and S. M. Feinstone. 2001. Hepatitis C viruses, p. 1127–1161. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
 31. Manns, M. P., J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J. K. Albrecht. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**:958–965.
 32. Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki. 2008. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* **82**:7964–7976.
 33. Matsumoto, M., S. B. Hwang, K. S. Jeng, N. Zhu, and M. M. Lai. 1996. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**:43–51.
 34. McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21**:3980–3988.
 35. McMullan, L. K., A. Grakoui, M. J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A. D. Branch, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:2879–2884.
 36. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**:1089–1097.
 37. Moradpour, D., C. Englert, T. Wakita, and J. R. Wands. 1996. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* **222**:51–63.
 38. Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, and C. M. Rice. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **78**:7400–7409.
 39. Morota, K., R. Fujinami, H. Kinukawa, T. Machida, K. Ohno, H. Saegusa, and K. Takeda. 2009. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J. Virol. Methods* **157**:8–14.
 40. Murray, C. L., C. T. Jones, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. *J. Virol.* **81**:10220–10231.
 41. Ogino, T., H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, M. Kohara, and A. Nomoto. 2004. Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *J. Virol.* **78**:11766–11777.
 42. Pavlovic, D., D. C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R. A. Dwek, W. B. Fischer, and N. Zitzmann. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:6104–6108.
 43. Poyndar, T., M. F. Yuen, V. Ratzu, and C. L. Lai. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* **362**:2095–2100.
 44. Ray, R. B., and R. Ray. 2001. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:149–156.
 45. Reynolds, J. E., A. Kaminski, H. J. Kettinen, K. Grace, B. E. Clarke, A. R. Carroll, D. J. Rowlands, and R. J. Jackson. 1995. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* **14**:6010–6020.
 46. Rocha-Perugini, V., M. Lavie, D. Delgrange, J. Canton, A. Pillez, J. Potel, C. Leceur, E. Rubinstein, J. Dubuisson, C. Wychowski, and L. Cocquerel. 2009. The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol.* **9**:111.
 47. Rouille, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouard, J. McKeating, A. H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* **80**:2832–2841.
 48. Russell, R. S., J. C. Meunier, S. Takikawa, K. Faulk, R. E. Engle, J. Bukh, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 2008. Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:4370–4375.
 49. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **68**:3631–3641.
 50. Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1999. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J. Virol.* **73**:9718–9725.
 51. Smith, D. B., and P. Simmonds. 1997. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J. Mol. Evol.* **45**:238–246.
 52. Tanaka, Y., T. Shimoike, K. Ishii, R. Suzuki, T. Suzuki, H. Ushijima, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 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.
 53. Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **66**:1476–1483.
 54. Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara, and R. Bartenschlager. 2008. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J. Virol.* **82**:11503–11515.
 55. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K.

- Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**:791–796.
56. Wang, T. H., R. C. Rijnbrand, and S. M. Lemon. 2000. Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* **74**:11347–11358.
57. Yu, K. L., S. I. Jang, and J. C. You. 2009. Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res.* **145**:285–292.
58. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:9294–9299.

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

La protéine de capsid du HCV est la plus conservée parmi les protéines codées par le génome viral (Bukh *et al.*, 1994). La région N-terminale de la protéine C est riche en aa basiques qui la rendent plus hydrophile (Boulant *et al.*, 2005). Ces résidus basiques sont regroupés principalement dans deux régions. La première est située entre les aa 6 à 23 et la seconde entre les aa 39 à 62. Ces deux régions sont séparées par une séquence de résidus neutres (Klein *et al.*, 2005). En utilisant des vecteurs d'expression *in vitro*, il a été suggéré que ces deux régions soient nécessaires à l'interaction protéine C-ARN génomique et à l'assemblage de la nucléocapside virale. Cependant, leur rôle n'avait pas encore été étudié dans le contexte du cycle viral du HCV. Dans mes travaux de thèse, l'importance de ces deux régions composées d'aa basiques a été évaluée en utilisant le système HCVcc.

A. Rôle limité des aa basiques de 6 à 23 pour l'infectiosité du HCV

Des études réalisées avec des vecteurs d'expression en système acellulaire ont montré que les résidus basiques situés entre les aa 6 à 23 de la forme mature de la protéine pourraient être impliqués dans l'assemblage et la formation de la nucléocapside du HCV. En effet, dans un système d'assemblage *in vitro*, le pourcentage d'inhibition de la formation de la nucléocapside augmente avec le nombre d'aa basiques mutés ou délétés (Klein *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2004). Cependant, une autre construction de la capsid comportant une délétion des aa 8 à 23 avait un effet très limité sur l'assemblage *in vitro* (Fromentin *et al.*, 2007). Au cours de notre travail, nous avons montré que des modifications portant sur ces résidus basiques et regroupant 2 ou 3 aa diminuaient à la fois, pour certains mutants, la production des particules virales infectieuses et la réplication virale. Néanmoins, ces mutants restaient infectieux et étaient capables de se propager en culture cellulaire.

Le virus GBV-B, un agent infectieux proche du HCV, a été utilisé comme modèle d'étude du HCV (Martin *et al.*, 2003). La protéine C du virus GBV-B présente une similarité avec celle du HCV bien qu'elle soit plus courte de 35 aa (156 aa contre 191 aa pour le HCV) dans le domaine (D1). La protéine C de ces deux virus contient un domaine (D2) qui est absent chez les autres membres de la famille *Flaviviridae* (Boulant *et al.*, 2005; Hope *et al.*, 2002). En comparant les deux protéines, Hourieux et collaborateurs ont montré que la

délétion des aa de 15 à 28 de la protéine C du HCV, sans équivalent chez le virus GBV-B, était sans effet sur l'assemblage des VLP (Hourieux *et al.*, 2007a).

Comme nous l'avons vu dans la partie I.C.6, l'extrémité N-terminale de la séquence codant la protéine C contient des éléments structuraux sous la forme de deux tiges-boucles nommés SLV et SLVI compris respectivement entre les résidus 16 à 28 et 29 à 56 (Smith & Simmonds, 1997). Deux études récentes, réalisées sur le rôle de la protéine F dans le cycle viral, ont montré un effet de ces structures sur la réplication virale (McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008). Des mutations perturbant la structure de la tige boucle SLV atténuent la réplication virale à 24 h après électroporation. Cependant, cette atténuation disparaît plus tard au cours de l'infection (Vassilaki *et al.*, 2008). Dans notre travail, un de nos mutants R17R18K23 diminue légèrement la réplication virale. Les changements d'acides aminés de ce mutant se situent complètement au niveau de cette tige boucle, ce qui pourrait expliquer l'effet sur la réplication. Par ailleurs, Vassilaki et collaborateurs ont suggéré que l'intégrité de la tige boucle SLV est importante pour la traduction des protéines virales (Vassilaki *et al.*, 2008). En effet, d'après certaines études nous savons que la séquence nucléotidique de l'extrémité N-terminale de la protéine C est impliquée dans le fonctionnement de l'IRES du HCV (Reynolds *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000). Par ailleurs, deux protéines cellulaires NSAP1 et hnRNP L, requises pour l'activité de l'IRES du HCV, interagissent avec la séquence correspondant à cette région (Hahm *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004a). Celles-ci ont une plus grande affinité pour une séquence riche en adénosines, ce qui correspond à celle de la région des premiers 23 aa de la protéine C (Hwang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2004a). Il est intéressant d'observer que les mutants K6R9K10, R17R18K23 et RK/8A, pour lesquels la traduction dépendante de l'IRES viral était diminuée ou inhibée, ont tous plusieurs adénosines remplacées par des cytosines ou des guanosines. Contrairement aux autres mutants, les aa K12 et R13 ne semblent pas avoir un effet sur la production des particules virales infectieuses.

Nos résultats suggèrent que les aa basiques de cette région ont un rôle limité dans l'assemblage viral et que leur effet sur la production virale est une conséquence de la diminution de la traduction/réplication virale induite par les modifications nucléotidiques.

B. Caractérisation des aa basiques 39 à 62 : un rôle crucial pour l'infectiosité

La région comprenant les aa 39 à 62 contient 10 aa basiques avec 9 arginines et une seule lysine en position 51. En outre, parmi ces 10 aa basiques, 7 d'entre eux sont situés au niveau de la tige boucle SLVI (Smith & Simmonds, 1997). Dans les travaux récents des équipes de C.M. Rice et R. Bartenschlager, il a été montré que cette structure jouait un rôle important dans la réplication virale (McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008). En effet, des mutations, introduites dans cette région pour inhiber l'expression de la protéine F sans affecter ni modifier celle de la protéine C, diminuent la réplication virale en culture cellulaire (McMullan *et al.*, 2007). Plus spécifiquement les nucléotides correspondant à R47 semblent être des facteurs limitant la réplication du génome viral (McMullan *et al.*, 2007). Nos résultats indiquent que les mutants R39R40R43 et R47R50K51, et plus particulièrement R39 et R47, diminuent la réplication du HCV en perturbant la structure de la tige boucle SLVI. Les modifications nucléotidiques amenées par la mutation de ces deux arginines affectent l'appariement des bases nucléotidiques à la même position dans la tige boucle SLVI. Il est possible que la SLVI soit impliquée dans des interactions ARN-ARN qui jouent un rôle dans la réplication du HCV. Ces interactions nécessitent probablement l'intégrité structurale de la SLVI qui est stabilisée par sa partie centrale. De telles interactions ARN-ARN à distance, impliquées dans la traduction et la réplication virales, ont déjà été décrites entre les régions 3' NC et 5' NC et entre la SLVI et la région 5' NC (Kim *et al.*, 2003; Romero-Lopez & Berzal-Herranz, 2009).

Les travaux réalisés sur le rôle des aa basiques de cette partie de la protéine C *in vitro* suggèrent qu'ils sont importants pour la formation des nucléocapsides virales (Fromentin *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2005). Le taux d'assemblage diminue avec l'augmentation du nombre des résidus basiques mutés (Klein *et al.*, 2005). De plus, il semble que la charge positive globale de cette région soit importante pour l'assemblage plutôt qu'un aa basique spécifique (Fromentin *et al.*, 2007). Cependant, contrairement aux études *in vitro*, le système HCVcc prend en compte l'effet de l'environnement cellulaire et les autres facteurs viraux sur les étapes tardives de l'assemblage et de la maturation de la nucléocapside. De plus, à l'époque de ces travaux, l'effet des aa sur l'infectiosité du virus n'a pas été évalué en raison de l'absence d'un système de propagation du HCV en culture cellulaire. Dans notre travail, nous avons montré que la modification de ces résidus, par groupes de 2 à 3 aa, abolissait complètement la production des particules virales infectieuses intra- et extracellulaires.

Toutefois, nous n'avons pas vérifié leur impact sur la multimérisation de la protéine C. De plus, l'analyse individuelle de ces résidus a révélé que les aa basiques R50, K51, R59 et R62 sont cruciaux pour la production des particules virales infectieuses intra- et extracellulaires.

Peu de données sont disponibles sur le rôle de la région N-terminale dans la morphogénèse du HCV. La délétion des résidus 60 à 66 de la protéine C est sans effet sur l'assemblage et le bourgeonnement des VLP du HCV au niveau des membranes du RE (Hourieux *et al.*, 2007a). Toutefois, les VLP ne sont pas secrétées par ce système et l'évaluation du rôle de ces résidus pour la production virale n'est pas possible. Très récemment, l'importance des aa 57 à 191 pour le HCV a été étudiée dans le système HCVcc (Kopp *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2007). Murray et collaborateurs ont montré que des délétions dans D1 et D2 déstabilisent la protéine C, la rendant plus facilement dégradable, et inhibent ainsi la production du virus (Murray *et al.*, 2007). Or, certaines de ces délétions contenaient toujours les 83 ou 124 premiers acides aminés nécessaires à l'assemblage des nucléocapsides *in vitro* (Kim *et al.*, 2006; Kunkel *et al.*, 2001; Majeau *et al.*, 2004). Ces données indiquent une fois de plus l'importance de l'environnement cellulaire et du système HCVcc pour évaluer le rôle de la protéine de capsid au cours du cycle viral. En modifiant quatre aa à la fois dans la séquence de la protéine C, Murray et collaborateurs ont montré que les deux mutants C57-60A et C61-64A étaient non infectieux (Murray *et al.*, 2008). Or, ces deux mutants contiennent les deux résidus arginines, R59 et R62, identifiés dans notre étude comme indispensables à l'infectiosité du HCV.

Malgré la faible similarité en séquence peptidique entre différents membres de la famille *Flaviviridae*, leurs protéines de capsid partagent des caractéristiques structurales communes. En effet, avec une taille de 100 à 127 aa, la protéine C des flavivirus et pestivirus présente des similitude avec l'extrémité N-terminale de celle du HCV (117 aa). En effet, la protéine C de ces virus contient deux régions de résidus basiques séparées par une séquence hydrophobe. De plus, Ces régions sont impliquées dans l'interaction avec l'ARN viral (Dokland *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004; Majeau *et al.*, 2004). Toutefois, à l'exception du GBV-B, aucun d'entre eux ne contient un domaine D2 nécessaire à l'association de la protéine C aux GLs (Boulant *et al.*, 2005), même si la protéine C du virus de la Dengue peut également interagir avec les GLs (Samsa *et al.*, 2009). Il est important de noter que les virus GBV-A et GBV-C, qui sont aussi des membres de la famille *Flaviviridae*, ne semblent pas posséder de protéine équivalente à la protéine C (Lindenbach *et al.*, 2007). Récemment, un nouveau virus de la famille *Flaviviridae*, dénomé GBV-D, a été découvert et son génome code une protéine basique putative de 57 aa en amont de la protéine E1. Toutefois, le rôle exact de cette protéine

n'est pas encore connu (Epstein *et al.*, 2010). Contrairement au HCV, les pestivirus et les flavivirus sont capables de tolérer des délétions dans la protéine C tout en conservant leur capacité à produire des particules virales infectieuses (Kofler *et al.*, 2002; Patkar *et al.*, 2007; Ruemenapf *et al.*, 2010; Schlick *et al.*, 2009). Ces données indiquent qu'il existe des contraintes supplémentaires au niveau de la protéine C du HCV pour l'assemblage de la particule virale.

Les gouttelettes lipidiques (GLs) jouent un rôle crucial dans les étapes précoces de la formation des nucléocapsides (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007). La forme mature de la protéine C est associée à ces organelles grâce aux deux hélices de son domaine D2 (Boulant *et al.*, 2005). L'assemblage pourrait débuter par l'interaction entre la protéine C et la région 5' NC de l'ARN viral (Fan *et al.*, 1999; Shimoike *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). Comme pour d'autres flavivirus, les protéines non-structurales participent également à l'assemblage des virions (pour revue (Murray *et al.*, 2008)). Il a été montré que les protéines du complexe de réplication sont recrutées aux GLs par les interactions de la NS5A avec la protéine C et les GLs (voire II 5.4). La production virale est considérablement inhibée en mutant les résidus de NS5A responsables de ces interactions (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007; Tellinghuisen *et al.*, 2008a). La protéine NS3 participe également aux étapes précoces de l'assemblage puisque l'oligomérisation de la protéine C et la formation des nucléocapsides est dépendante de certaines mutations d'adaptation présentes dans NS3 (Ma *et al.*, 2008). Nos résultats indiquent que la modification des résidus basiques R50, K51, R59 et R62 ne change pas la colocalisation subcellulaire de la protéine C par rapport aux GLs et à la protéine NS5A. Par ailleurs, ces mutations n'inhibent ni l'interaction de la protéine C avec l'ARN génomique ni la formation des nucléocapsides. Nos résultats suggèrent donc que ces aa basiques pourraient être impliqués dans une étape ultérieure à l'assemblage de la nucléocapside virale.

La protéine C est associée aux membranes du RE et aux GLs par son extrémité C-terminale hydrophobe (Boulant *et al.*, 2005). Il a été suggéré que les nucléocapsides néoformées dans le cytoplasme, à proximité des GLs, bourgeonnent au niveau des membranes du RE. Les nucléocapsides enveloppées peuvent suivre ensuite les différentes voies de maturation. Ai et collaborateurs ont caractérisé l'interaction et l'enveloppement de la protéine C par les membranes intracellulaires. Ils ont révélé que cette étape d'enveloppement joue un rôle important pour l'assemblage des particules virales infectieuses du HCV (Ai *et al.*, 2009). Les délétions des aa 88 à 106 et 42 à 68 diminuent fortement l'enveloppement de la protéine C par les membranes intracellulaires (Ai *et al.*, 2009). Les aa de la première délétion

correspondent au domaine d'interaction homotypique de la protéine C (Matsumoto *et al.*, 1996; Nolandt *et al.*, 1997) tandis que ceux de la deuxième délétion sont impliqués dans la formation de la nucléocapside *in vitro* (Fromentin *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2005). Toutefois, les quatre aa basiques identifiés au cours de notre travail (R50, K51, R59 et R 62) et localisés dans la deuxième délétion ne semblent pas avoir un effet sur l'enveloppement de la protéine C. Ces résultats suggèrent que ces résidus basiques affectent plutôt une étape qui se déroule après la formation de la nucléocapside et son enveloppement par les membranes intracellulaires.

Par ailleurs, il a été montré que la partie N-terminale de la protéine C est non structurée *in vitro* (Boulant *et al.*, 2005; Duvignaud *et al.*, 2009; Kunkel & Watowich, 2004). Toutefois, durant l'assemblage et en présence des séquences de la région 5'NC, cette partie subit des changements conformationnels pour adapter des structures en feuillets- β qui sont importantes pour la formation et la stabilité de la nucléocapside *in vitro* (Carmona & Molina, 2010; Rodriguez-Casado *et al.*, 2007). Ces changements sont déclenchés par l'interaction entre les charges positives des résidus basiques de cette partie N-terminale et l'ARN négativement chargé (Carmona & Molina, 2010). La mutation des aa R50, K51, R59 et R62 n'affecte ni l'encapsidation de l'ARN viral ni la formation des nucléocapsides. Cependant, il n'est pas exclu qu'ils soient impliqués dans des changements structuraux nécessaires à des étapes plus tardives de la maturation des particules virales infectieuses.

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont associées également aux membranes du RE (Rouille *et al.*, 2006). Elles forment des hétérodimères qui s'assemblent en complexes multimériques stabilisés par des ponts disulfures à la surface des particules virales infectieuses (Vieyres *et al.*, 2010). De plus, ces protéines sont nécessaires à l'entrée virale. Les particules virales acquièrent ces deux protéines pendant le bourgeonnement des nucléocapsides au niveau des membranes du RE où elles sont ancrées. Différents travaux ont rapporté la possibilité d'une interaction entre les protéines C et E1 *via* leurs extrémités C-terminales (Lo *et al.*, 1996; Nakai *et al.*, 2006). Cette interaction semble nécessiter l'oligomérisation de la protéine C (Nakai *et al.*, 2006). Aucune interaction entre les protéines d'enveloppe et la protéine C n'a cependant été observée (Dubuisson, 2000). Des études réalisées sur les particules virales appartenant à d'autres flavivirus ont montré une absence d'interaction directe entre la nucléocapside et les protéines d'enveloppe (Zhang *et al.*, 2003). Dans notre travail, cette interaction n'a pas été étudiée, tout en sachant que les résidus identifiés dans la partie N-terminale de la protéine C n'avaient pas d'effet sur son oligomérisation.

C. Conclusions et perspectives

Le rôle des aa basiques de l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid (C) a été étudié au cours du cycle infectieux du HCV. Notre travail a montré que les résidus basiques situés entre les aa 6 à 23 ne contiennent aucun motif ou résidu spécifique nécessaire à l'infectiosité du HCV. L'importance de la séquence codant cette région a été confirmée pour la traduction des protéines virales. Nos résultats ont permis d'identifier quatre aa basiques (R50, K51, R59 et R62) cruciaux pour la production des particules virales infectieuses. Ces résidus n'affectent pas la colocalisation de la protéine C avec les GLs et la protéine NS5A, l'encapsidation de l'ARN génomique, l'oligomérisation de la protéine C et son enveloppement par les membranes intracellulaires. Le mécanisme par lequel ces résidus basiques modulent la production des particules infectieuses reste donc à identifier.

Dans la continuité de ce travail, les cellules transfectées par électroporation ont été entretenues au cours des passages pour étudier le comportement de ces mutants. Nos résultats préliminaires montrent que les modifications R59A et R62A sont létales pour le virus puisque l'expression de la protéine C disparaît sans restauration de l'infectiosité du virus. Par contre, les mutants R50A et K51A redeviennent infectieux après une vingtaine de jours en culture cellulaire (Figure 27).

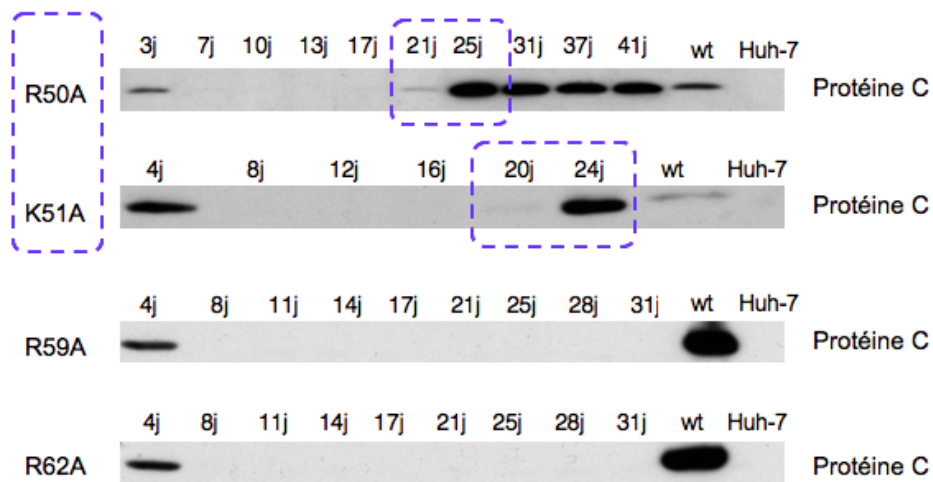


Figure 27 : Détection par immuno-empreinte de la protéine de capsid dans des lysats de cellules Huh-7 transfectées avec l'ARN transcrit des mutants

Les cellules électroporées avec les ARN des mutants R50, K51, R59 et R62 ont été passées en culture cellulaire tous les 3 à 4 jours (j). L'évolution de chaque mutant a été suivie par la présence ou l'absence de détection par immuno-empreinte de la protéine de capsid dans les lysats de cellules Huh-7. Les mutants révertants et la période de restauration de l'infectiosité sont marqués en bleu.

Le séquençage de ces génomes sera réalisé pour déterminer si des réversions ont eu lieu ou si des mutations de compensation sont apparues sur d'autres protéines virales. Dans l'étude de Murray et collaborateurs, certains mutants de la protéine C ont récupéré leur infectiosité grâce à des mutations de compensation apparues dans p7, NS2 et NS3 (Murray *et al.*, 2007). La présence de telles mutations nous permettrait de vérifier quelles sont les protéines virales potentiellement impliquées dans le blocage de l'infectiosité du HCV et d'étudier davantage les interactions entre ces protéines et la protéine C afin de déterminer leur importance dans l'assemblage.

Puisque l'extrémité N-terminale de la protéine C subit des modifications conformationnelles, il serait également intéressant d'étudier en microscopie électronique l'impact de ces mutations sur la morphogenèse des nucléocapsides. Cette approche permettrait de vérifier si d'éventuels changements de taille ou de forme sont observables entre les nucléocapsides formées par les mutants et le virus parental. Les limitations d'une telle approche résident cependant dans la difficulté à identifier la formation de particules virales au sein de la cellule infectée (Rouille *et al.*, 2006).

Des modifications post-traductionnelles pourraient représenter une autre possibilité pour expliquer l'impact de nos mutations sur l'assemblage viral. Les aa peuvent être à l'origine d'une modification post-traductionnelle. Ainsi, plusieurs modifications post-traductionnelles de la protéine C ont été décrites comme pouvant influencer l'infectiosité du HCV. La transglutaminase tissulaire est capable de modifier la protéine C en créant un lien γ -carboxyl- ϵ -lysine isopeptide entre une glutamine et une lysine. Cette modification est responsable de la formation d'un dimère stable de la protéine C (Lu *et al.*, 2001). Toutefois, cette modification n'a pas été étudiée dans le système HCVcc. La protéine C peut être ubiquitinylée par l'ubiquitine ligase E6AP (Shirakura *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2001). Cette modification post-traductionnelles est responsable de la dégradation de la protéine C par la voie du protéasome dépendant de l'ubiquitine, conduisant ainsi à la diminution de la production virale (Shirakura *et al.*, 2007). Il a été également montré que les sérines 53, 99 et 116 de la protéine C sont phosphorylées (Lu & Ou, 2002; Shih *et al.*, 1995). La mutation de la serine 99 inhibe la production virale (Murray *et al.*, 2007). Toutefois, le mécanisme exact de cette inhibition n'est pas encore connu. Majeau et collaborateurs ont montré que la C172 de la protéine C est palmitoylée (Majeau *et al.*, 2009). Cette modification n'interfère pas avec la maturation de la protéine C par la SPP ou son association au GLs. Toutefois, elle est importante pour l'association de la protéine C aux membranes du RE lisse et celles qui sont

très proche des GLs. La mutation de cette cystéine diminue considérablement la production de virus infectieux (Majeau *et al.*, 2009).

Les aa arginines peuvent être modifiés principalement par méthylation dans des séquences peptidiques riches en glycines et arginines (pour revue (Bedford & Richard, 2005)). De nombreux motifs de méthylation ont été proposés tels que RG, RG(G/X), R(G/X)(G/X)R, GRG, RXR (Rho *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1999). La lysine peut être également méthylée ou acétylée. Différentes études ont montré l'implication de telles modifications dans le cycle viral de certains virus comme l'hépatite D (HDV), l'adénovirus de type 5 (AD5) et le HIV (Koyuncu & Dobner, 2009; Tseng *et al.*, 2008; Willemsen *et al.*, 2006). Des motifs, ressemblant à ceux déjà décrits, existent au niveau des résidus arginines dans la région 39 à 62 (Figure 28). Il serait intéressant de vérifier si les résidus basiques identifiés au cours de notre travail sont impliqués dans de telles modifications post-traductionnelles.

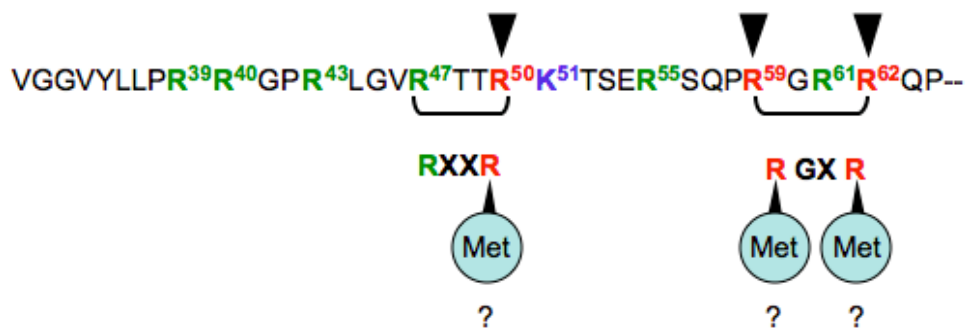


Figure 28 : Les sites potentiels de méthylation localisés entre les aa 39 à 62.

Les arginines (R) qui peuvent être à l'origine d'une modification post-traductionnelle par méthylation (Met) sont marquées en rouge. Les motifs comprenant ces résidus sont également présentés.

Finalement, élucider la base moléculaire de l'inhibition de l'assemblage du HCV exercée par les quatre résidus basiques modifiés pourrait représenter une nouvelle stratégie pour de nouveaux traitements anti-HCV.

BIBLIOGRAPHIE

V. BIBLIOGRAPHIE

- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S. & Matsuura, Y. (2007). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* **81**, 8953-8966.
- Aberle, J. H., Formann, E., Steindl-Munda, P., Weseslindtner, L., Gurguta, C., Perstinger, G., Grilnberger, E., Laferl, H., Dienes, H. P., Popow-Kraupp, T., Ferenci, P. & Holzmann, H. (2006). Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* **36**, 24-31.
- Abraham, J. D., Himoudi, N., Kien, F., Berland, J. L., Codran, A., Bartosch, B., Baumert, T., Paranhos-Baccala, G., Schuster, C., Inchauspe, G. & Kieny, M. P. (2004). Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *Vaccine* **22**, 3917-3928.
- Acosta-Rivero, N., Falcon, V., Alvarez, C., Musacchio, A., China, G., Cristina de la Rosa, M., Rodriguez, A., Duenas-Carrera, S., Tsutsumi, V., Shibayama, M., Menendez, I., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M. M., Kouri, J. & Morales-Grillo, J. (2003). Structured HCV nucleocapsids composed of P21 core protein assemble primary in the nucleus of *Pichia pastoris* yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 48-53.
- Acosta-Rivero, N., Rodriguez, A., Musacchio, A., Poutou, J., Falcon, V., Torres, D., Aguilar, J. C., Linares, M., Alonso, M., Perez, A., Menendez, I., Morales-Grillo, J., Marquez, G. & Duenas-Carrera, S. (2005). A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 901-906.
- Adinolfi, L. E., Gambardella, M., Andreana, A., Tripodi, M. F., Utili, R. & Ruggiero, G. (2001). Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* **33**, 1358-1364.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12766-12771.
- Ai, L. S., Lee, Y. W. & Chen, S. S. (2009). Characterization of hepatitis C virus core protein multimerization and membrane envelopment: revelation of a cascade of core-membrane interactions. *J Virol* **83**, 9923-9939.
- Ait-Goughoulte, M., Hourieux, C., Patient, R., Trassard, S., Brand, D. & Roingeard, P. (2006). Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol* **87**, 855-860.
- Aligo, J., Jia, S., Manna, D. & Konan, K. V. (2009). Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. *Virology* **393**, 68-83.
- Alisi, A., Giambartolomei, S., Cupelli, F., Merlo, P., Fontemaggi, G., Spaziani, A. & Balsano, C. (2003). Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* **22**, 2573-2580.
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**, 459-463.
- Alter, M. J. (2002). Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S93-98.
- Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **13**, 2436-2441.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. & Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**, 6919-6928.
- Appel, N., Pietschmann, T. & 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. *J Virol* **79**, 3187-3194.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* **281**, 9833-9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **4**, e1000035.
- Ascione, A., De Luca, M., Tartaglione, M. T., Lampasi, F., Di Costanzo, G. G., Lanza, A. G., Picciotto, F. P., Marino-Marsilia, G., Fontanella, L. & Leandro, G. (2010). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin is

- more effective than peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 116-122.
- Asselah, T., Rubbia-Brandt, L., Marcellin, P. & Negro, F. (2006).** Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* **55**, 123-130.
- Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J. P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F. & Inchauspe, G. (2004).** Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* **78**, 10460-10469.
- Bakr, I., Rekeciewicz, C., El Hosseiny, M., Ismail, S., El Daly, M., El-Kafrawy, S., Esmat, G., Hamid, M. A., Mohamed, M. K. & Fontanet, A. (2006).** Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut* **55**, 1183-1187.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T. & Brechot, C. (1997).** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1200-1205.
- Baril, M. & 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 Res* **33**, 1474-1486.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. (1993).** Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* **67**, 3835-3844.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004).** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**, 71-180.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. & Koch, J. O. (1995).** Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* **69**, 7519-7528.
- 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., Von Weizsacker, F., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2003).** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**, 41003-41012.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F. L. & Purcell, R. H. (2003a).** In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14199-14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003b).** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633-642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J. M., Lavillette, D. & Cosset, F. L. (2005).** An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* **79**, 8217-8229.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F. L. (2003c).** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**, 41624-41630.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* **72**, 3827-3836.
- Baumert, T. F., Wellnitz, S., Aono, S., Satoi, J., Herion, D., Tilman Gerlach, J., Pape, G. R., Lau, J. Y., Hoofnagle, J. H., Blum, H. E. & Liang, T. J. (2000).** Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **32**, 610-617.
- Bedford, M. T. & Richard, S. (2005).** Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**, 263-272.
- Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996).** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12-22.
- Belon, C. A. & Frick, D. N. (2009).** Fuel specificity of the hepatitis C virus NS3 helicase. *J Mol Biol* **388**, 851-864.
- Benali-Furet, N. L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R. & Paterlini-Brechot, P. (2005).** Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* **24**, 4921-4933.
- Benga, W. J., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T. F. & Schuster, C. (2010).** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**, 43-53.

- Bigger, C. B., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (2001).** DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**, 7059-7066.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M. B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., Baumert, T. F. & Pietschmann, T. (2010).** Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog* **6**, e1000978.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006).** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**, 6964-6972.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. & Roingeard, P. (2002).** Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* **76**, 4073-4079.
- Blanchard, E., Hourieux, C., Brand, D., Ait-Goughoulte, M., Moreau, A., Trassard, S., Sizaret, P. Y., Dubois, F. & Roingeard, P. (2003).** Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. *J Virol* **77**, 10131-10138.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000).** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972-1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002).** Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**, 13001-13014.
- Blight, K. J. & Rice, C. M. (1997).** Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **71**, 7345-7352.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Haussinger, D. (2003).** IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* **17**, 488-490.
- Boni, S., Lavergne, J. P., Boulant, S. & Cahour, A. (2005).** Hepatitis C virus core protein acts as a transmodulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem* **280**, 17737-17748.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. & Lavergne, J. P. (2003).** Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* **278**, 45785-45792.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratnien, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F. & McLauchlan, J. (2006).** Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* **281**, 22236-22247.
- Boulant, S., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2007).** Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* **88**, 2204-2213.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J. P. (2005).** Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* **79**, 11353-11365.
- Bowen, D. G. & Walker, C. M. (2005).** Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**, 946-952.
- Bradley, D. W., Maynard, J. E., Popper, H., Cook, E. H., Ebert, J. W., McCaustland, K. A., Schable, C. A. & Fields, H. A. (1983).** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* **148**, 254-265.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130-8139.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. & Crotta, S. (2008).** CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* **82**, 8316-8329.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13034-13039.
- Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I. C., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2009).** Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. *J Virol* **83**, 11682-11693.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. & Lemon, S. M. (1992).** Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* **20**, 5041-5045.
- Bukh, J., Meuleman, P., Tellier, R., Engle, R. E., Feinstone, S. M., Eder, G., Satterfield, W. C., Govindarajan, S., Krawczynski, K., Miller, R. H., Leroux-Roels, G. & Purcell, R. H. (2010).** Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *J Infect Dis* **201**, 1381-1389.
- Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1993).** At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8234-8238.

- Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1994).** Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8239-8243.
- Bungyoku, Y., Shoji, I., Makine, T., Adachi, T., Hayashida, K., Nagano-Fujii, M., Ide, Y. H., Deng, L. & Hotta, H. (2009).** Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**, 1681-1691.
- Caetano, J., Martinho, A., Paiva, A., Pais, B., Valente, C. & Luxo, C. (2008).** Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV. *J Virol* **82**, 7567-7577.
- Cai, Z., Zhang, C., Chang, K. S., Jiang, J., Ahn, B. C., Wakita, T., Liang, T. J. & Luo, G. (2005).** Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol* **79**, 13963-13973.
- Carmona, P. & Molina, M. (2010).** Interactions of protein and nucleic acid components of hepatitis C virus as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **49**, 4724-4731.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* **76**, 3720-3730.
- Carroll, S. S., Ludmerer, S., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N. R., Graham, D., Davies, M. E., MacCoss, M., Hazuda, D. & Olsen, D. B. (2009).** Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 926-934.
- Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. (2007).** Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**, 13783-13793.
- Chatterji, U., Bobardt, M. D., Lim, P. & Gallay, P. A. (2010).** Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *J Gen Virol* **91**, 1189-1193.
- Chen, S. L. & Morgan, T. R. (2006).** The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* **3**, 47-52.
- Chevaliez, S. & Pawlotsky, J. M. (2007).** Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* **13**, 2461-2466.
- Choi, S. H., Kim, S. Y., Park, K. J., Kim, Y. J. & Hwang, S. B. (2004).** Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. *J Biochem Mol Biol* **37**, 735-740.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C. & et al. (1994).** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1294-1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P. J. & et al. (1991).** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2451-2455.
- Chung, R. T. (2005).** Acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 1**, S14-17.
- Ciczora, Y., Callens, N., Montpellier, C., Bartosch, B., Cosset, F. L., Op de Beeck, A. & Dubuisson, J. (2005).** Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *J Gen Virol* **86**, 2793-2798.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pecheur, E. I. & Dubuisson, J. (2007).** Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J Virol* **81**, 2372-2381.
- Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C. S., Burgess, S., Harris, M. & Rowlands, D. (2006).** Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *J Biol Chem* **281**, 37057-37068.
- Clayton, R. F., Owsianka, A., Aitken, J., Graham, S., Bhella, D. & Patel, A. H. (2002).** Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* **76**, 7672-7682.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J. C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1999).** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **73**, 2641-2649.
- Corless, L., Crump, C. M., Griffin, S. D. & Harris, M. (2010).** Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* **91**, 362-372.
- Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004).** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7270-7274.

- Cramp, M. E., Rossol, S., Chokshi, S., Carucci, P., Williams, R. & Naoumov, N. V. (2000). Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**, 346-355.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R. M., Bonino, F., Abrignani, S. & Valiante, N. M. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* **195**, 35-41.
- Davidson, F., Simmonds, P., Ferguson, J. C., Jarvis, L. M., Dow, B. C., Follett, E. A., Seed, C. R., Krusius, T., Lin, C., Medgyesi, G. A. & et al. (1995). Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* **76** (Pt 5), 1197-1204.
- Davis, G. L. & Lindsay, K. L. (2005). Treatment of chronic hepatitis C infection: one step at a time. *Lancet Infect Dis* **5**, 524-526.
- Day, C. L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., McGovern, B., Wurcel, A. G., Gandhi, R. T., Chung, R. T. & Walker, B. D. (2002). Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* **76**, 12584-12595.
- De Francesco, R. & Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* **436**, 953-960.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* **71**, 697-704.
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G. & Wychowski, C. (2007). Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **88**, 2495-2503.
- Des Jarlais, D. C., Diaz, T., Perlis, T., Vlahov, D., Maslow, C., Latka, M., Rockwell, R., Edwards, V., Friedman, S. R., Monterroso, E., Williams, I. & Garfein, R. S. (2003). Variability in the incidence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among young injecting drug users in New York City. *Am J Epidemiol* **157**, 467-471.
- Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S., Majano, P. L., Benedicto, I., Rosado, J. A., Salido, G. M. & Gonzalez-Gallego, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *J Hepatol* **50**, 872-882.
- Dokland, T., Walsh, M., Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Ee, K. H. & Wang, S. (2004). West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* **12**, 1157-1163.
- Dreux, M., Dao Thi, V. L., Fresquet, J., Guerin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D., Cosset, F. L. & Bartosch, B. (2009). Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* **5**, e1000310.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P. E., Keck, Z., Foug, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., Bartenschlager, R., Lavillette, D. & Cosset, F. L. (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* **281**, 18285-18295.
- Drummer, H. E., Maerz, A. & Pombourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **546**, 385-390.
- Drummer, H. E. & Pombourios, P. (2004). Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *J Biol Chem* **279**, 30066-30072.
- Dubois, F., Desenclos, J. C., Mariotte, N. & Goudeau, A. (1997). Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatology* **25**, 1490-1496.
- Dubuisson, J. (2000). Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**, 135-148.
- Dubuisson, J. (2007). Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* **13**, 2406-2415.
- Dubuisson, J., Duvet, S., Meunier, J. C., Op De Beeck, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Cocquerel, L. (2000). Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein. *J Biol Chem* **275**, 30605-30609.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**, 6147-6160.
- Dumoulin, F. L., von dem Bussche, A., Li, J., Khamzina, L., Wands, J. R., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2003). Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* **305**, 260-266.

- Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P. L., Sherlock, S., McIntyre, N. & Simmonds, P. (1994). Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* **19**, 13-18.
- Duvignaud, J. B., Savard, C., Fromentin, R., Majeau, N., Leclerc, D. & Gagne, S. M. (2009). Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 27-31.
- EASL (1999). EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol* **31 Suppl** 3-8.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* **78**, 11288-11295.
- Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M. & Glenn, J. S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77**, 6055-6061.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M. & 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. *J Virol* **78**, 11393-11400.
- Elghouzzi, M. H., Bouchardeau, F., Pillonel, J., Boiret, E., Tirtaine, C., Barlet, V., Moncharmont, P., Maisonneuve, P., du Puy-Montbrun, M. C., Lyon-Caen, D. & Courouge, A. M. (2000). Hepatitis C virus: routes of infection and genotypes in a cohort of anti-HCV-positive French blood donors. *Vox Sang* **79**, 138-144.
- Eng, F. J., Walewski, J. L., Klepper, A. L., Fishman, S. L., Desai, S. M., McMullan, L. K., Evans, M. J., Rice, C. M. & Branch, A. D. (2009). Internal initiation stimulates production of p8 minicore, a member of a newly discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms. *J Virol* **83**, 3104-3114.
- Epstein, J. H., Quan, P. L., Briese, T., Street, C., Jabado, O., Conlan, S., Ali Khan, S., Verdugo, D., Hossain, M. J., Hutchison, S. K., Egholm, M., Luby, S. P., Daszak, P. & Lipkin, W. I. (2010). Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. *PLoS Pathog* **6**, e1000972.
- Erdtmann, L., Franck, N., Lerat, H., Le Seyec, J., Gilot, D., Cannie, I., Gripon, P., Hibner, U. & Guguen-Guillouzo, C. (2003). The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 18256-18264.
- Evans, M. J., Rice, C. M. & Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13038-13043.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernhe, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-805.
- Failla, C., Tomei, L. & De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* **68**, 3753-3760.
- Fan, Z., Yang, Q. R., Twu, J. S. & Sherker, A. H. (1999). Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *J Med Virol* **59**, 131-134.
- Farci, P., Alter, H. J., Govindarajan, S., Wong, D. C., Engle, R., Lesniewski, R. R., Mushahwar, I. K., Desai, S. M., Miller, R. H., Ogata, N. & et al. (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**, 135-140.
- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. & Purcell, R. H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7792-7796.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzera, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J. & 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15394-15399.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767-770.
- Feinstone, S. M., Mihalik, K. B., Kamimura, T., Alter, H. J., London, W. T. & Purcell, R. H. (1983). Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* **41**, 816-821.
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967-972.

- Ferron, F., Bussetta, C., Dutartre, H. & Canard, B. (2005). The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics* 6, 255.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J. D., Lavergne, J. P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G. & Bain, C. (2007). Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 88, 1149-1162.
- Flisiak, R., Feinman, S. V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J. E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Metral, V., Groscurin, P., Liz, J. S., Scalfaro, P., Porchet, H. & Crabbe, R. (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 49, 1460-1468.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B. B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., Lahm, A., Luzzago, A., Vitelli, A., Colloca, S., Cortese, R. & Nicosia, A. (2006). A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12, 190-197.
- Forns, X., Payette, P. J., Ma, X., Satterfield, W., Eder, G., Mushahwar, I. K., Govindarajan, S., Davis, H. L., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2000). Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 32, 618-625.
- Franck, N., Le Seyec, J., Guguen-Guillouzo, C. & Erdtmann, L. (2005). Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol* 79, 2700-2708.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., Anwar, W. & Sallam, I. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355, 887-891.
- Frese, M., Schwarzle, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S., Haller, O. & Bartenschlager, R. (2002). Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 35, 694-703.
- Frick, D. N. (2007). The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol* 9, 1-20.
- Frick, D. N., Rypma, R. S., Lam, A. M. & Gu, B. (2004). The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem* 279, 1269-1280.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P. & Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79, 380-392.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75, 12047-12057.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J. & Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347, 975-982.
- Fromentin, R., Majeau, N., Laliberte Gagne, M. E., Boivin, A., Duvignaud, J. B. & Leclerc, D. (2007). A method for in vitro assembly of hepatitis C virus core protein and for screening of inhibitors. *Anal Biochem* 366, 37-45.
- Gal-Tanamy, M., Christopher, W., Fong, S. & Lemon, S. M. (2009). Chapter 24 - Hepatitis C. In *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*, 1st edition edn, pp. 413-440. Edited by A. D. T. B. L. R. Stanberry: Academic Press
- 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. & 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.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., 2nd, Lemm, J. A., Wang, C., Knipe, J. O., Chien, C., Colonno, R. J., Grasela, D. M., Meanwell, N. A. & Hamann, L. G. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465, 96-100.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82, 2120-2129.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006). Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 80, 11074-11081.
- Gerlach, J. T., Ulsenheimer, A., Gruner, N. H., Jung, M. C., Schraut, W., Schirren, C. A., Heeg, M., Scholz, S., Witter, K., Zahn, R., Vogler, A., Zchoval, R., Pape, G. R. & Diepolder, H. M. (2005). Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 79, 12425-12433.

- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F. L., Montpellier, C. & Dubuisson, J. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **79**, 8400-8409.
- Goffard, A. & Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* **85**, 295-301.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**, 5487-5492.
- Gottwein, J. M. & Bukh, J. (2008). Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv Virus Res* **71**, 51-133.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Hoegh, A. M., Lademann, J. B., Eugen-Olsen, J., Lisby, G. & Bukh, J. (2007). Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology* **133**, 1614-1626.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M. & Bukh, J. (2009). Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**, 364-377.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. & Rouille, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**, 773-787.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F. & Moradpour, D. (2009). An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *J Virol* **83**, 11378-11384.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993a). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10583-10587.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J. H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M. & Walker, C. M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659-662.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993b). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* **67**, 1385-1395.
- Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D. & Harris, M. (2005). Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol* **79**, 15525-15536.
- Griffin, S., Stgelais, C., Owsianka, A. M., Patel, A. H., Rowlands, D. & Harris, M. (2008). Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* **48**, 1779-1790.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. & 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.
- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J. S., Leroux-Roels, G., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007). Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *J Virol* **81**, 3162-3169.
- 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., Cerny, A. & Pape, G. R. (2000). Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* **181**, 1528-1536.
- Hahm, B., Kim, Y. K., Kim, J. H., Kim, T. Y. & Jang, S. K. (1998). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* **72**, 8782-8788.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pecheur, E. I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* **284**, 17657-17667.
- Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M. M., Miyamura, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* **79**, 13473-13482.
- Han, Q., Xu, C., Wu, C., Zhu, W., Yang, R. & Chen, X. (2009). Compensatory mutations in NS3 and NS5A proteins enhance the virus production capability of hepatitis C reporter virus. *Virus Res* **145**, 63-73.
- 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., Han, J. H., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**, 5007-5020.

- He, L. F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H. J. & Purcell, R. H. (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* **156**, 636-640.
- Heck, J. A., Meng, X. & Frick, D. N. (2009). Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. *Biochem Pharmacol* **77**, 1173-1180.
- Heckel, J. L., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. (1990). Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* **62**, 447-456.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z. Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007). The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* **81**, 8101-8111.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M. & Shimotohno, K. (1991). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1993a). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* **67**, 4665-4675.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1993b). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10773-10777.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1993c). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* **67**, 1953-1958.
- Hirano, M., Kaneko, S., Yamashita, T., Luo, H., Qin, W., Shirota, Y., Nomura, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2003). Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* **278**, 5109-5115.
- Hollinger, F. B., Gitnick, G. L., Aach, R. D., Szmuness, W., Mosley, J. W., Stevens, C. E., Peters, R. L., Weiner, J. M., Werch, J. B. & 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., Beard, M. R., Ping, L. H. & Lemon, S. M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* **73**, 1165-1174.
- Honda, M., Brown, E. A. & Lemon, S. M. (1996a). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* **2**, 955-968.
- Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. & Lemon, S. M. (1996b). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* **222**, 31-42.
- Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S21-29.
- Hope, R. G., McElwee, M. J. & McLauchlan, J. (2006). Efficient cleavage by signal peptide peptidase requires residues within the signal peptide between the core and E1 proteins of hepatitis C virus strain J1. *J Gen Virol* **87**, 623-627.
- Hope, R. G., Murphy, D. J. & McLauchlan, J. (2002). The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* **277**, 4261-4270.
- Hourieux, C., Ait-Goughoulte, M., Patient, R., Fouquenot, D., Arcanger-Doudet, F., Brand, D., Martin, A. & Roingeard, P. (2007a). Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* **9**, 1014-1027.
- Hourieux, C., Patient, R., Morin, A., Blanchard, E., Moreau, A., Trassard, S., Giraudeau, B. & Roingeard, P. (2007b). The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* **56**, 1302-1308.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7271-7276.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr. & Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5848-5853.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. & Cameron, C. E. (2005). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 36417-36428.
- Huang, P., Goff, D. A., Huang, Q., Martinez, A., Xu, X., Crowder, S., Issakani, S. D., Anderson, E., Sheng, N., Achacoso, P., Yen, A., Kinsella, T., Darwish, I. S., Kolluri, R., Hong, H., Qu, K., Stauffer, E., Goldstein, E., Singh, R., Payan, D. G. & Lu, H. H. (2008). Discovery and characterization of

- substituted diphenyl heterocyclic compounds as potent and selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1419-1429.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**, 70-81.
- Hussy, P., Langen, H., Mous, J. & Jacobsen, H. (1996). Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* **224**, 93-104.
- Hwang, B., Lim, J. H., Hahm, B., Jang, S. K. & Lee, S. W. (2009). hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 584-588.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K. & Lemon, S. M. (2002). Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* **76**, 2997-3006.
- Ishida, S., Kaito, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, N., Ikoma, J., Adachi, Y. & Watanabe, S. (2001). Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology* **20**, 335-347.
- Ishii, S. & Koziel, M. J. (2008). Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* **128**, 133-147.
- Ivanyi-Nagy, R., Kanevsky, I., Gabus, C., Lavergne, J. P., Ficheux, D., Penin, F., Fosse, P. & Darlix, J. L. (2006). Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* **34**, 2618-2633.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002). The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* **76**, 13088-13093.
- Jensen, T. B., Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Hoegh, A. M., Eugen-Olsen, J. & Bukh, J. (2008). Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J Infect Dis* **198**, 1756-1765.
- Jhaveri, R., McHutchison, J., Patel, K., Qiang, G. & Diehl, A. M. (2008). Specific polymorphisms in hepatitis C virus genotype 3 core protein associated with intracellular lipid accumulation. *J Infect Dis* **197**, 283-291.
- Jiang, J. & Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **83**, 12680-12691.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N. & Hayashi, N. (2004). Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* **173**, 6072-6081.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* **283**, 28546-28562.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**, 8374-8383.
- Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2009). The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol* **83**, 2163-2177.
- Jopling, C. L., Schutz, S. & Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* **4**, 77-85.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577-1581.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tanaka, H., Fujita, N., Konishi, M., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Gabazza, E. C., Adachi, Y., Tsukiyama-Kohara, K. & Kohara, M. (2006). Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med* **18**, 673-678.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. & Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* **75** (Pt 7), 1755-1760.
- Kalliampakou, K. I., Kalamvoki, M. & Mavromara, P. (2005). Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation. *J Gen Virol* **86**, 1015-1025.
- Kang, S. M., Choi, J. K., Kim, S. J., Kim, J. H., Ahn, D. G. & Oh, J. W. (2009). Regulation of hepatitis C virus replication by the core protein through its interaction with viral RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 55-59.

- Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H. & Kamada, T. (1994). Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* **19**, 296-302.
- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* **81**, 374-383.
- Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M. & Shimotohno, K. (2005). Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol* **86**, 645-656.
- Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraio, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (1992). Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* **22**, 107-123.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & 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. & Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* **64**, 334-339.
- Kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R. K., Murthy, K., Wakita, T. & Liang, T. J. (2007). Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* **81**, 4405-4411.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J. & Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* **5**, e1000546.
- Kaul, A., Woerz, I., Meuleman, P., Leroux-Roels, G. & Bartenschlager, R. (2007). Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. *J Virol* **81**, 13168-13179.
- Keck, Z. Y., Xia, J., Cai, Z., Li, T. K., Owsianka, A. M., Patel, A. H., Luo, G. & Fong, S. K. (2007). Immunogenic and functional organization of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E2 on infectious HCV virions. *J Virol* **81**, 1043-1047.
- Kenny-Walsh, E. (1999). Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* **340**, 1228-1233.
- Khattab, M. A. (2009). Targeting host factors: a novel rationale for the management of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* **15**, 3472-3479.
- Kim, D. W., Gwack, Y., Han, J. H. & Choe, J. (1995). C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 160-166.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Ha, S. H., Cho, S., Choi, K., Kim, C. S., Ryu, S. H. & Jang, S. K. (2004a). A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* **24**, 7878-7890.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. & Caron, P. R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* **6**, 89-100.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A., O'Malley, E. T., Harbeson, S. L., Rice, C. M., Murcko, M. A., Caron, P. R. & Thomson, J. A. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* **87**, 343-355.
- Kim, K., Kim, K. H., Ha, E., Park, J. Y., Sakamoto, N. & Cheong, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett* **583**, 2720-2726.
- Kim, M., Ha, Y. & Park, H. J. (2006). Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* **122**, 137-143.
- Kim, S. J., Kim, J. H., Kim, Y. G., Lim, H. S. & Oh, J. W. (2004b). Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 50031-50041.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H. & Jang, S. K. (2002). Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 105-112.
- Kim, Y. K., Lee, S. H., Kim, C. S., Seol, S. K. & Jang, S. K. (2003). Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* **9**, 599-606.

- Klein, K. C., Dellos, S. R. & Lingappa, J. R. (2005). Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *J Virol* **79**, 6814-6826.
- Klein, K. C., Polyak, S. J. & Lingappa, J. R. (2004). Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J Virol* **78**, 9257-9269.
- Kneteman, N. M., Weiner, A. J., O'Connell, J., Collett, M., Gao, T., Aukerman, L., Kovelsky, R., Ni, Z. J., Zhu, Q., Hashash, A., Kline, J., Hsi, B., Schiller, D., Douglas, D., Tyrrell, D. L. & Mercer, D. F. (2006). Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* **43**, 1346-1353.
- Koch, J. O. & Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* **73**, 7138-7146.
- Kofler, R. M., Heinz, F. X. & Mandl, C. W. (2002). Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J Virol* **76**, 3534-3543.
- Koike, K., Moriya, K. & Matsuura, Y. (2010). Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* **40**, 69-82.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-574.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**, 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & 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. *J Virol* **74**, 2046-2051.
- Kopp, M., Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. (2010). Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **84**, 1666-1673.
- Korenaga, M., Wang, T., Li, Y., Showalter, L. A., Chan, T., Sun, J. & Weinman, S. A. (2005). Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* **280**, 37481-37488.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* **81**, 588-598.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* **80**, 5308-5320.
- Koyuncu, O. O. & Dobner, T. (2009). Arginine methylation of human adenovirus type 5 L4 100-kilodalton protein is required for efficient virus production. *J Virol* **83**, 4778-4790.
- Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* **75**, 4614-4624.
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., Grunert, F., Dao Thi, V. L., Dreux, M., Cosset, F. L., McKeating, J. A., Schuster, C. & Baumert, T. F. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144-1157.
- Kriegs, M., Burckstummer, T., Himmelsbach, K., Bruns, M., Frelin, L., Ahlen, G., Sallberg, M. & Hildt, E. (2009). The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impairs both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo. *J Biol Chem* **284**, 28343-28351.
- Krishnadas, D. K., Li, W., Kumar, R., Tyrrell, D. L. & Agrawal, B. (2010). HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: Implications for viral persistence or clearance. *Vaccine* **28**, 2104-2114.
- Kuang, W. F., Lin, Y. C., Jean, F., Huang, Y. W., Tai, C. L., Chen, D. S., Chen, P. J. & Hwang, L. H. (2004). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase activity is modulated by the two domains of NS3 and NS4A. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 211-217.
- Kuiken, C. & Simmonds, P. (2009). Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* **510**, 33-53.
- Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M. & Watowich, S. J. (2001). Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* **75**, 2119-2129.
- Kunkel, M. & Watowich, S. J. (2002). Conformational changes accompanying self-assembly of the hepatitis C virus core protein. *Virology* **294**, 239-245.
- Kunkel, M. & Watowich, S. J. (2004). Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Lett* **557**, 174-180.
- Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J. & Ray, R. (1998). Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol* **72**, 3539-3546.

- Lai, C. K., Jeng, K. S., Machida, K. & Lai, M. M. (2008). Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol* **82**, 8838-8848.
- Lai, M. E., Mazzoleni, A. P., Argioli, F., De Virgili, S., Balestrieri, A., Purcell, R. H., Cao, A. & Farci, P. (1994). Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* **343**, 388-390.
- Lam, A. M. & Frick, D. N. (2006). Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol* **80**, 404-411.
- Lambot, M., Fretier, S., Op De Beeck, A., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V. & Dubuisson, J. (2002). Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *J Biol Chem* **277**, 20625-20630.
- Lang, C. A., Conrad, S., Garrett, L., Battistutta, D., Cooksley, W. G., Dunne, M. P. & Macdonald, G. A. (2006). Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection. *J Pain Symptom Manage* **31**, 335-344.
- 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., Dusheiko, G., Allen, T. M., Chung, R. T., Walker, B. D. & Klenerman, P. (2004). High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **127**, 924-936.
- Lauer, G. M. & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**, 41-52.
- Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver Int* **29 Suppl 1**, 74-81.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F. L., Penin, F. & Pecheur, E. I. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**, 3909-3917.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J. M. & Cosset, F. L. (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. *J Virol* **79**, 6023-6034.
- Lavillette, D., Pecheur, E. I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. & 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. *J Virol* **81**, 8752-8765.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K. & Cosset, F. L. (2005b). Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265-274.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., Fox, R. I., Ball, J. K., McKeating, J. A., Kneteman, N. M. & Burton, D. R. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**, 25-27.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. & Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**, 1499-1512.
- Lee, H., Shin, H., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2004). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **78**, 10865-10877.
- Lehmann, M., Meyer, M. F., Monazahian, M., Tillmann, H. L., Manns, M. P. & Wedemeyer, H. (2004). High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *J Med Virol* **73**, 387-391.
- Lemon, S. M., Walker, C., Alter, M. J. & Yi, M. (2007). Hepatitis C Virus. In *Fields Virology*, pp. 1253-1304. Edited by D. M. K. P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. & 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.
- Li, D., Takyar, S. T., Lott, W. B. & 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. *J Gen Virol* **84**, 815-825.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-2997.
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17717-17722.

- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* **68**, 5063-5073.
- Lin, C., Thomson, J. A. & 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. *J Virol* **69**, 4373-4380.
- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., Holtzman, M. J. & Chung, R. T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* **80**, 9226-9235.
- 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. & Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwollegem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E., Leroux-Roels, G. & Rice, C. M. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3805-3809.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H. J. & Rice, C. M. (2007). Hepatitis C Virus. In *Fields Virology*, pp. 1101-1152. Edited by D. M. K. P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009a). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* **83**, 2011-2014.
- Liu, Z., Yang, F., Robotham, J. M. & Tang, H. (2009b). Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* **83**, 6554-6565.
- Lo, S. Y., Selby, M. J. & Ou, J. H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* **70**, 5177-5182.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10149-10154.
- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **71**, 8416-8428.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & 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. & Morales, J. (2001). Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 962-965.
- Love, R. A., Parge, H. E., Wickersham, J. A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E. W., Adachi, T. & Hostomska, Z. (1996). The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* **87**, 331-342.
- Lu, W. & Ou, J. H. (2002). Phosphorylation of hepatitis C virus core protein by protein kinase A and protein kinase C. *Virology* **300**, 20-30.
- Lu, W., Strohecker, A. & Ou Jh, J. H. (2001). Post-translational modification of the hepatitis C virus core protein by tissue transglutaminase. *J Biol Chem* **276**, 47993-47999.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Venien-Bryan, C. & Zitzmann, N. (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12712-12716.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G. & Persson, M. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* **77**, 5428-5438.
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J. & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3414-3419.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. & Yi, M. (2010). Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J Virol*.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**, 7624-7639.

- Machida, K., Cheng, K. T., Sung, V. M., Lee, K. J., Levine, A. M. & Lai, M. M. (2004). Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* **78**, 8835-8843.
- Maheshwari, A., Ray, S. & Thuluvath, P. J. (2008). Acute hepatitis C. *Lancet* **372**, 321-332.
- Maieron, A., Metz-Gercek, S., Hackl, F., Ziahehabi, A., Fuchsteiner, H., Luger, C., Mittermayer, H. & Schofl, R. (2010). Antiviral treatment of chronic hepatitis C in clinical routine. *Wien Klin Wochenschr* **122**, 237-242.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R. & Budkowska, A. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* **75**, 8240-8250.
- Majeau, N., Fromentin, R., Savard, C., Duval, M., Tremblay, M. J. & Leclerc, D. (2009). Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production. *J Biol Chem* **284**, 33915-33925.
- Majeau, N., Gagne, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J. A., Ouellet, D. & Leclerc, D. (2004). The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *J Gen Virol* **85**, 971-981.
- Majeau, N., Gagne, V., Bolduc, M. & Leclerc, D. (2005). Signal peptide peptidase promotes the formation of hepatitis C virus non-enveloped particles and is captured on the viral membrane during assembly. *J Gen Virol* **86**, 3055-3064.
- Major, M. E., Dahari, H., Mihalik, K., Puig, M., Rice, C. M., Neumann, A. U. & Feinstone, S. M. (2004). Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* **39**, 1709-1720.
- Manigold, T., Shin, E. C., Mizukoshi, E., Mihalik, K., Murthy, K. K., Rice, C. M., Piccirillo, C. A. & Rehermann, B. (2006). Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* **107**, 4424-4432.
- Manns, M. P., Wedemeyer, H. & Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**, 1350-1359.
- Marcellin, P., Gish, R. G., Gitlin, N., Heise, J., Halliman, D. G., Chun, E. & Rodriguez-Torres, M. (2010). Safety and efficacy of virmidine versus ribavirin in ViSER2: randomized, double-blind study in therapy-naïve hepatitis C patients. *J Hepatol* **52**, 32-38.
- Martin, A., Bodola, F., Sangar, D. V., Goettge, K., Popov, V., Rijnbrand, R., Lanford, R. E. & Lemon, S. M. (2003). Chronic hepatitis associated with GB virus B persistence in a tamarin after intrahepatic inoculation of synthetic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9962-9967.
- Martinot-Peignoux, M., Roudot-Thoraval, F., Mendel, I., Coste, J., Izopet, J., Duverlie, G., Payan, C., Pawlotsky, J. M., Defer, C., Bogard, M., Gerolami, V., Halfon, P., Buisson, Y., Fouqueray, B., Loiseau, P., Lamoril, J., Lefrere, J. J. & Marcellin, P. (1999). Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. *J Viral Hepat* **6**, 435-443.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T. & Suzuki, T. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* **82**, 7964-7976.
- Matsumoto, M., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Zhu, N. & Lai, M. M. (1996). Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**, 43-51.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C. S., Whitt, M. A. & Miyamura, T. (2001). Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263-275.
- McCaffrey, A. P., Ohashi, K., Meuse, L., Shen, S., Lancaster, A. M., Lukavsky, P. J., Sarnow, P. & Kay, M. A. (2002). Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* **5**, 676-684.
- McHutchison, J. G., Manns, M. P., Muir, A. J., Terrault, N. A., Jacobson, I. M., Afdhal, N. H., Heathcote, E. J., Zeuzem, S., Reesink, H. W., Garg, J., Bsharat, M., George, S., Kauffman, R. S., Adda, N. & Di Bisceglie, A. M. (2010). Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* **362**, 1292-1303.
- McLauchlan, J. (2009). Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 552-559.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980-3988.
- McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2879-2884.

- McOmish, F., Yap, P. L., Dow, B. C., Follett, E. A., Seed, C., Keller, A. J., Cobain, T. J., Krusius, T., Kolho, E., Naukkarinen, R. & et al. (1994). Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* **32**, 884-892.
- Mee, C. J., Harris, H. J., Farquhar, M. J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van, I. S. C., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* **83**, 6211-6221.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* **80**, 11571-11578.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L. & Simmonds, P. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* **76** (Pt 10), 2493-2507.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L. & Kneteman, N. M. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**, 927-933.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. & Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* **48**, 1761-1768.
- Meunier, J. C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F. L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4560-4565.
- Meunier, J. C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (1999). Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* **80** (Pt 4), 887-896.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172.
- Miyazari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089-1097.
- Mohd-Ismail, N. K., Deng, L., Sukumaran, S. K., Yu, V. C., Hotta, H. & Tan, Y. J. (2009). The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human Mcl-1. *J Virol* **83**, 9993-10006.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghera, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A. & Maurel, P. (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* **46**, 411-419.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S. & Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* **57**, 223-229.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004a). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **78**, 13278-13284.
- Moradpour, D., Evans, M. J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H. E., Goff, S. P., Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2004b). Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* **78**, 7400-7409.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E. & Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* **60**, 103-109.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-463.
- Moradpour, D., Wakita, T., Tokushige, K., Carlson, R. I., Krawczynski, K. & Wands, J. R. (1996). Characterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol* **48**, 234-241.
- Mousseau, G., Kota, S., Takahashi, V., Frick, D. & Strosberg, A. D. (2010). Dimerization-driven interaction of hepatitis c virus core protein with NS3 helicase. *J Gen Virol*.
- Muir, A. J., Shiffman, M. L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., Gordon, S. C., Marotta, P., Vierling, J. M., Lopez-Talavera, J. C., Byrnes-Blake, K., Fontana, D., Freeman, J., Gray, T., Hausman, D., Hunder, N. N. & Lawitz, E. (2010). Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* **52**, 822-832.

- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N. & 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.
- Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. (2008). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 699-708.
- Murray, C. L., Jones, C. T., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007). Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**, 10220-10231.
- Nakai, K., Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Ishii, K., Lim, C. K., Tani, H., Matsuo, E., Abe, T., Mori, Y., Suzuki, T., Miyamura, T., Nunberg, J. H., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2006). Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* **80**, 11265-11273.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L. & De Francesco, R. (2004). Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* **78**, 13306-13314.
- Nelson, D. R., Benhamou, Y., Chuang, W. L., Lawitz, E. J., Rodriguez-Torres, M., Flisiak, R., Rasenack, J. W., Kryczka, W., Lee, C. M., Bain, V. G., Pianko, S., Patel, K., Cronin, P. W., Pulkstenis, E., Subramanian, G. M. & McHutchison, J. G. (2010). Albinterferon Alfa-2b Was Not Inferior to Pegylated Interferon-alpha in a Randomized Trial of Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 2 or 3. *Gastroenterology* **139**, 1267-1276 e1264.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-107.
- Niederau, C., Lange, S., Heintges, T., Erhardt, A., Buschkamp, M., Hurter, D., Nawrocki, M., Kruska, L., Hensel, F., Petry, W. & Haussinger, D. (1998). Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* **28**, 1687-1695.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Bevitt, D. J. & Toms, G. L. (2004). Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. *J Gen Virol* **85**, 1497-1507.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumechockchai, W. & Toms, G. L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* **80**, 2418-2428.
- Nolandt, O., Kern, V., Muller, H., Pfaff, E., Theilmann, L., Welker, R. & Krausslich, H. G. (1997). Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1331-1340.
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H. & Purcell, R. H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3392-3396.
- Ogino, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Kohara, M. & Nomoto, A. (2004). Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *J Virol* **78**, 11766-11777.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* **25**, 5015-5025.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, L. & Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* **82**, 2589-2595.
- Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F. & Dubuisson, J. (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem* **275**, 31428-31437.
- Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Foug, S., Cosset, F. L. & Dubuisson, J. (2004). Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **78**, 2994-3002.
- Pacini, L., Graziani, R., Bartholomew, L., De Francesco, R. & Paonessa, G. (2009). Naturally occurring hepatitis C virus subgenomic deletion mutants replicate efficiently in Huh-7 cells and are trans-packaged in vitro to generate infectious defective particles. *J Virol* **83**, 9079-9093.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orru, S., Narjes, F. & Steinkuhler, C. (2001). Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol* **75**, 9939-9946.
- Pancholi, P., Perkus, M., Tricoche, N., Liu, Q. & Prince, A. M. (2003). DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. *J Virol* **77**, 382-390.

- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & 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.
- Patkar, C. G., Jones, C. T., Chang, Y. H., Warriar, R. & Kuhn, R. J. (2007). Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol* **81**, 6471-6481.
- Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6104-6108.
- Pawlotsky, J. M., Dahari, H., Neumann, A. U., Hezode, C., Germanidis, G., Lonjon, I., Castera, L. & Dhumeaux, D. (2004). Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **126**, 703-714.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P. O., Deleage, G. & 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. *J Virol* **75**, 5703-5710.
- Petit, M. A., Lievre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R. W. & Trepo, C. (2005). Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* **336**, 144-153.
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L. & Gale, M., Jr. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4650-4655.
- Phan, T., Beran, R. K., Peters, C., Lorenz, I. C. & Lindenbach, B. D. (2009). Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* **83**, 8379-8395.
- Pieron, L., Santolini, E., Fipaldini, C., Pacini, L., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1997). In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J Virol* **71**, 6373-6380.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L. & Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* **76**, 4008-4021.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.
- Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hezode, C. & Pawlotsky, J. M. (2008). Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* **48**, 16-27.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882-886.
- Popescu, C. I. & Dubuisson, J. (2009). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* **102**, 63-74.
- Post, J. J., Pan, Y., Freeman, A. J., Harvey, C. E., White, P. A., Palladinetti, P., Haber, P. S., Marinos, G., Levy, M. H., Kaldor, J. M., Dolan, K. A., Ffrench, R. A., Lloyd, A. R. & Rawlinson, W. D. (2004). Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* **189**, 1846-1855.
- Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W. & Millian, S. J. (1974). Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* **2**, 241-246.
- Puig, M., Major, M. E., Mihalik, K. & Feinstone, S. M. (2004). Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* **22**, 991-1000.
- Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B. C., Belohradsky, B., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2002). Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J Med Virol* **68**, 335-342.
- Raney, K. D., Sharma, S. D., Moustafa, I. M. & Cameron, C. E. (2010). Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* **285**, 22725-22731.
- Ratinier, M., Boulant, S., Crussard, S., McLauchlan, J. & Lavergne, J. P. (2009). Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus Res* **139**, 106-110.
- Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* **119**, 1745-1754.

- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. & Jackson, R. J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* **14**, 6010-6020.
- Rho, J., Choi, S., Seong, Y. R., Choi, J. & Im, D. S. (2001). The arginine-1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* **75**, 8031-8044.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P. J., Haasnoot, P. C., Kieft, J. S., Spaan, W. J. & Lemon, S. M. (2001). The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* **7**, 585-597.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin i, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L. & Weiner, A. (1998). Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* **143**, 2493-2503.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J. & Cocquerel, L. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* **3**, e1866.
- Rodriguez-Casado, A., Molina, M. & Carmona, P. (2007). Spectroscopic study of conformational changes accompanying self-assembly of HCV core protein. *Proteins* **66**, 110-117.
- Romero-Lopez, C. & Berzal-Herranz, A. (2009). A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA* **15**, 1740-1752.
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J. P., Boulant, S., Walic, M., Andreo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A., McLauchlan, J. & Budkowska, A. (2009). Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **284**, 13778-13791.
- Rossignol, J. F., Kabil, S. M., El-Gohary, Y., Elfert, A. & Keeffe, E. B. (2008). Clinical trial: randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide monotherapy for the treatment of patients with chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther* **28**, 574-580.
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* **80**, 2832-2841.
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (2003). Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* **84**, 1751-1759.
- Rubbia-Brandt, L., Fabris, P., Paganin, S., Leandro, G., Male, P. J., Giostra, E., Carlotto, A., Bozzola, L., Smedile, A. & Negro, F. (2004). Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* **53**, 406-412.
- Ruemenapf, T. H., Riedel, C., Heimann, M., Thiel, H. J. & Lamp, B. (2010). Viability of a pestivirus without core protein is supported by mutations in NS3. *abstr 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Yokohama, Japan*.
- Saito, K., Meyer, K., Warner, R., Basu, A., Ray, R. B. & Ray, R. (2006). Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* **80**, 4372-4379.
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J. & Gale, M., Jr. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* **454**, 523-527.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11646-11651.
- Sakamoto, N. & Watanabe, M. (2009). New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* **44**, 643-649.
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assuncao-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., Bozza, P. T. & Gamarnik, A. V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**, e1000632.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F. L. & Bartosch, B. (2005). Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol* **86**, 3189-3199.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **68**, 3631-3641.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G. & Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* **69**, 7461-7471.

- Sarobe, P., Lasarte, J. J., Casares, N., Lopez-Diaz de Cerio, A., Baixeras, E., Labarga, P., Garcia, N., Borrás-Cuesta, F. & Prieto, J. (2002). Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* **76**, 5062-5070.
- Sarrazin, C. & Zeuzem, S. (2010). Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 447-462.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**, 5017-5025.
- Scheel, T. K., Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Prentoe, J. C., Hoegh, A. M., Alter, H. J., Eugen-Olsen, J. & Bukh, J. (2008). Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 997-1002.
- Schlick, P., Taucher, C., Schittl, B., Tran, J. L., Kofler, R. M., Schueler, W., von Gabain, A., Meinke, A. & Mandl, C. W. (2009). Helices alpha2 and alpha3 of West Nile virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions. *J Virol* **83**, 5581-5591.
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**, 44052-44063.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T. S. & Ott, M. (2004). Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* **78**, 7958-7968.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J. & Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* **282**, 37158-37169.
- She, Y., Liao, Q., Chen, X., Ye, L. & Wu, Z. (2008). Hepatitis C virus (HCV) NS2 protein up-regulates HCV IRES-dependent translation and down-regulates NS5B RdRp activity. *Arch Virol* **153**, 1991-1997.
- Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**, 558-567.
- Shih, C. M., Chen, C. M., Chen, S. Y. & Lee, Y. H. (1995). Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol* **69**, 1160-1171.
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K. & 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. *J Virol* **78**, 2738-2748.
- Shimakami, T., Honda, M., Kusakawa, T., Murata, T., Shimotohno, K., Kaneko, S. & Murakami, S. (2006). Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* **80**, 3332-3340.
- Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1996). Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* **23**, 205-209.
- Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T. & 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. & Miyamura, T. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* **73**, 9718-9725.
- Shin, E. C., Protzer, U., Untergasser, A., Feinstone, S. M., Rice, C. M., Hasselschwert, D. & Rehermann, B. (2005). Liver-directed gamma interferon gene delivery in chronic hepatitis C. *J Virol* **79**, 13412-13420.
- Shirakura, M., Murakami, K., Ichimura, T., Suzuki, R., Shimoji, T., Fukuda, K., Abe, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Moriishi, K., Matsuura, Y., Wakita, T., Suzuki, T., Howley, P. M., Miyamura, T. & Shoji, I. (2007). E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* **81**, 1174-1185.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* **277**, 11149-11155.
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghayeb, J., Reimann, K. A. & Walker, C. M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **197**, 1645-1655.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. & Widell, A. (2005).

- Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962-973.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J. & Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* **74** (Pt 11), 2391-2399.
- Smith, D. B. & Simmonds, P. (1997). Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol* **45**, 238-246.
- Smith, J. J., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H. R. & Wahle, E. (1999). Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J Biol Chem* **274**, 13229-13234.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R. & Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* **80**, 11579-11588.
- Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2008). Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol* **82**, 7034-7046.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Stumpf, M. P. & Pybus, O. G. (2002). Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 143-152.
- Sugiyama, K., Suzuki, K., Nakazawa, T., Funami, K., Hishiki, T., Ogawa, K., Saito, S., Shimotohno, K. W., Suzuki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Hijikata, M., Takaku, H. & Shimotohno, K. (2009). Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol* **83**, 6922-6928.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**, 2689-2699.
- Suzuki, R., Tamura, K., Li, J., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. & Suzuki, T. (2001). Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* **280**, 301-309.
- Tai, C. L., Chi, W. K., Chen, D. S. & Hwang, L. H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* **70**, 8477-8484.
- Takahashi, H., Akazawa, D., Kato, T., Date, T., Shirakura, M., Nakamura, N., Mochizuki, H., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., Suzuki, T. & Wakita, T. (2010). Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun* **395**, 565-571.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P. & Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **6**, 578-582.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J. & Shimotohno, K. (1995). A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 744-749.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307-3312.
- Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y. & 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., Satoh, S., Kaneko, T. & Shimotohno, K. (1995). Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol* **69**, 1575-1581.
- Targett-Adams, P., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008a). Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **82**, 2182-2195.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008b). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* **283**, 16850-16859.
- Tellinghuisen, T. L., Evans, M. J., von Hahn, T., You, S. & Rice, C. M. (2007). Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* **81**, 8853-8867.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. (2008a). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* **4**, e1000032.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C. & Rice, C. M. (2008b). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* **82**, 1073-1083.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* **279**, 48576-48587.

- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374-379.
- Tews, B. A., Popescu, C. I. & Dubuisson, J. (2010). Last Stop Before Exit – Hepatitis C Assembly and Release as Antiviral Drug Targets. *Viruses* **2**, 1782-1803.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15661-15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C. & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**, 1395-1406.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C. N. & Wells, P. A. (2009). Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry* **48**, 906-916.
- Thomson, M., Nascimbeni, M., Havert, M. B., Major, M., Gonzales, S., Alter, H., Feinstone, S. M., Murthy, K. K., Rehmann, B. & Liang, T. J. (2003). The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity. *J Virol* **77**, 862-870.
- Thomssen, R., Bonk, S. & Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* **182**, 329-334.
- Trestard, A., Bacq, Y., Buzelay, L., Dubois, F., Barin, F., Goudeau, A. & Roingeard, P. (1998). Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Arch Virol* **143**, 2241-2245.
- Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M. & Soudeyans, H. (2006). Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* **352**, 357-367.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**, 1734-1741.
- Tseng, C. H., Jeng, K. S. & Lai, M. M. (2008). Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis. *J Virol* **82**, 9409-9416.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476-1483.
- Tsukuma, H., Hiyama, T., Tanaka, S., Nakao, M., Yabuuchi, T., Kitamura, T., Nakanishi, K., Fujimoto, I., Inoue, A., Yamazaki, H. & et al. (1993). Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* **328**, 1797-1801.
- Uchida, M., Hino, N., Yamanaka, T., Fukushima, H., Imanishi, T., Uchiyama, Y., Kodama, T. & Doi, T. (2002). Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatology Res* **22**, 297-306.
- Ujino, S., Yamaguchi, S., Shimotohno, K. & Takaku, H. (2009). Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. *J Biol Chem* **284**, 6841-6846.
- van de Laar, T. J., Matthews, G. V., Prins, M. & Danta, M. (2010). Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection. *AIDS* **24**, 1799-1812.
- Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J. C., Alter, H., Purcell, R. H. & Leroux-Roels, G. (2008). Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* **47**, 1846-1855.
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U. & Mavromara, P. (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* **277**, 17713-17721.
- Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P. & Bartenschlager, R. (2008). Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* **82**, 11503-11515.
- Vassilaki, N. & Mavromara, P. (2003). Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem* **278**, 40503-40513.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H. & Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* **84**, 10159-10168.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**, 7793-7799.

- Voisset, C., Op de Beeck, A., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duverlie, G., Cosset, F. L., Vu-Dac, N. & Dubuisson, J. (2006). High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *J Gen Virol* **87**, 2577-2581.
- von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehmann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132**, 667-678.
- von Wagner, M., Huber, M., Berg, T., Hinrichsen, H., Rasenack, J., Heintges, T., Bergk, A., Bernsmeier, C., Haussinger, D., Herrmann, E. & Zeuzem, S. (2005). Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **129**, 522-527.
- W.H.O (2000). Hepatitis C--global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* **75**, 18-19.
- W.H.O (2009). http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html.
- Waggoner, S. N., Hall, C. H. & Hahn, Y. S. (2007). HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J Leukoc Biol* **82**, 1407-1419.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791-796.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D. & Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* **7**, 710-721.
- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N. & 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* **1**, 526-537.
- Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* **67**, 3338-3344.
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S. M. & Li, K. (2009). Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol* **83**, 9824-9834.
- Wang, T. H., Rijnbrand, R. C. & 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. *J Virol* **74**, 11347-11358.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y. & Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* **19**, 111-122.
- 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.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meervitch, K. & Pause, A. (2005). Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J Biol Chem* **280**, 29604-29611.
- Willemsen, N. M., Hitchen, E. M., Bodetti, T. J., Apolloni, A., Warrilow, D., Piller, S. C. & Harrich, D. (2006). Protein methylation is required to maintain optimal HIV-1 infectivity. *Retrovirology* **3**, 92.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* **74**, 2293-2304.
- Wu, W. B., Shao, S. W., Zhao, L. J., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S. Y. & Qi, Z. T. (2007). Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* **50**, 341-346.
- Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. & Stapleton, J. T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* **74**, 10055-10062.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. & Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**, 3840-3848.
- Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yoriyuzi, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T. & 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. & Ou, J. H. (2002). Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* **277**, 33228-33234.
- Yamanaka, T., Kodama, T. & Doi, T. (2002). Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 528-534.

- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8738-8743.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2291-2295.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S. C., Montelaro, R. C., Coyne, C. B. & Wang, T. (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* **283**, 8643-8653.
- Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V. & Weber, P. C. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* **4**, 463-467.
- Yazdanpanah, Y., De Carli, G., Miguera, B., Lot, F., Campins, M., Colombo, C., Thomas, T., Deufflic-Burban, S., Prevot, M. H., Domart, M., Tarantola, A., Abiteboul, D., Deny, P., Pol, S., Desenclos, J. C., Puro, V. & Bouvet, E. (2005). Risk factors for hepatitis C virus transmission to health care workers after occupational exposure: a European case-control study. *Clin Infect Dis* **41**, 1423-1430.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003). Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* **9**, 331-345.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2007). Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol* **81**, 629-638.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2009). Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* **5**, e1000403.
- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T. & Lemon, S. M. (2006). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2310-2315.
- Yoon, J. C., Shiina, M., Ahlenstiel, G. & Rehmann, B. (2009). Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* **49**, 12-21.
- Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L. & Lai, M. M. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* **80**, 6013-6023.
- Yu, K. L., Jang, S. I. & You, J. C. (2009). Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res* **145**, 285-292.
- Zein, N. N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* **13**, 223-235.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F. L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., Soulier, E., Schvoerer, E., Schuster, C., Stoll-Keller, F., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., Barth, H. & Baumert, T. F. (2007). 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* **46**, 1722-1731.
- Zeuzem, S., Yoshida, E. M., Benhamou, Y., Pianko, S., Bain, V. G., Shouval, D., Flisiak, R., Rehak, V., Grigorescu, M., Kaita, K., Cronin, P. W., Pulkstenis, E., Subramanian, G. M. & McHutchison, J. G. (2008). Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naive patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* **48**, 407-417.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004a). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* **78**, 1448-1455.
- Zhang, J., Yamada, O., Yoshida, H., Iwai, T. & Araki, H. (2002). Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* **293**, 141-150.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. & 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.
- Zhang, P., Wu, C. G., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Yu, M. Y., Alter, H. J. & Feinstone, S. M. (2007). Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8449-8454.
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G. & Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* **10**, 907-912.
- Zhang, Y., Weady, P., Duggal, R. & Hao, W. (2008). Novel chimeric genotype 1b/2a hepatitis C virus suitable for high-throughput screening. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 666-674.
- Zhao, W., Liao, G. Y., Jiang, Y. J. & Jiang, S. D. (2003). No requirement of HCV 5'NCR for HCV-like particles assembly in insect cells. *World J Gastroenterol* **9**, 2226-2231.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* **81**, 12465-12471.

- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9294-9299.
- Zhu, W., Chang, Y., Wu, C., Han, Q., Pei, R., Lu, M. & Chen, X. (2010).** The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 1139-1147.

RESUME

Le virus de l'hépatite C (HCV) touche environ 3% de la population mondiale constituant un problème majeur de santé publique. Son génome est un ARN de polarité positive code dix protéines virales : les protéines structurales (C, E1 et E2) qui participent à la formation des virions, et les protéines non-structurales (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont nécessaires à la réplication du génome viral. La protéine de capsid (C) du HCV est le composant essentiel de la nucléocapside. La séquence nucléotidique de son extrémité N-terminale est structurée avec l'IRES et formant des éléments importants pour la traduction/réplication virale appelés SL V et SL VI. La partie N-terminale de la protéine C (les premiers 120 aa) est un domaine hydrophile riche en aa basiques qui s'étendent principalement sur deux régions comprises entre les aa 6 à 23 et 39 à 65. Dans des systèmes acellulaires, la multimérisation de la capsid et l'interaction capsid-ARN ont été attribuées à ce domaine et ces résidus basiques. Cependant, leur importance dans le cycle viral demeure inconnue.

Pour évaluer le rôle de ces aa basiques dans l'infectiosité du HCV en culture cellulaire, ceux-ci ont été modifiés en alanine, d'abord par groupe, lorsque plusieurs aa étaient concernés, puis individuellement lorsque certains d'entre eux se révélaient importants. Les mutants résultant de la mutagenèse dirigée ont été étudiés dans le contexte de la souche infectieuse JFH1 du virus de l'hépatite C de génotype 2a. Nos résultats montrent que les mutations comprises entre les aa 6 à 23 diminuent l'infectiosité du VHC en culture cellulaire. Cependant, le virus était toujours capable de se propager en culture cellulaire. Nos résultats confirment également que la séquence nucléotidique de cette région est impliquée dans le fonctionnement de l'IRES viral, nécessaire à la traduction des protéines virales.

Par ailleurs, les mutations de la deuxième région (aa 39 à 65) affectent la production des particules virales infectieuses du HCV lorsqu'elles sont mutées en 2-3 aa. L'étude de l'effet individuel de chaque aa basique de cette région a permis d'identifier quatre acides aminés basiques (R50, K51, R59 et R62) cruciaux pour la production des particules virales infectieuses. La modification de ces résidus n'a pas d'effet sur la localisation subcellulaire de la protéine C, l'interaction protéine capsid-ARN, l'oligomérisation de la protéine de capsid et son enveloppement par les membranes intracellulaires.

Collectivement, nos données suggèrent que les acides aminés basiques R50, K51, R59 et R62 jouent un rôle majeur dans la formation des particules virales infectieuses au niveau d'une étape précoce avant la formation des particules virales infectieuses intracellulaires.

Abstract

With about 3% of people infected worldwide, hepatitis C is a major public health problem. Its positive single-strand RNA genome encodes at least 10 mature viral proteins that can be divided into: structural proteins (C, E1 and E2) that participate in the formation of infectious virions, and nonstructural proteins (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) required for viral replication. The core protein C is an essential component of the nucleocapsid. Its N-terminal coding sequence is structured with the viral IRES that contain elements, called SL V and SL VI, important for viral RNA translation/replication. The N-terminal end of the core protein (first 120 aa) is a hydrophilic domain rich in basic amino acids, which are concentrated in two clusters (aa 6 to 23) and (aa 39 to 65). In cell free systems, this domain and its basic residues have been proposed to be involved in core multimerization and RNA binding. However, their exact role in the viral cycle is still unknown.

Using alanine-scanning mutagenesis in the context of the infectious strain JFH1, we studied the impact of those clusters on the viral life cycle. First, they were mutated by groups of 2 or 3 aa and then individually when it is necessary. Our results showed that changing amino acids of the first cluster (aa 6 to 23) by groups of 2 or 3 aa decreased virus infectivity but the virus was still able to propagate in cells. In addition, we confirmed the involvement of the core coding sequence in the IRES function and viral proteins translation.

Moreover, mutation of the second basic cluster (aa 39 to 65) by groups of 2 or 3 aa led to loss of intracellular and extracellular infectious virus, in spite of successful translation, suggesting that these mutations inhibited virus assembly and secretion. To determine whether one or more basic residues were involved, they were modified separately. Only four basic amino acids residues of the second cluster (R50, K51, R59, and R62) were essential for the production of infectious viral particles. Mutation of these residues did not interfere with core subcellular localization, core-RNA interaction or core oligomerization. In addition, these mutations had no effect on core envelopment by intracellular membranes.

Together, these data indicate that R50, K51, R59, and R62 residues play a major role in the formation of infectious viral particles at an early step before the formation of intracellular infectious viral particle.