

Université des Sciences et Technologies de Lille
École Doctorale Biologie et Santé de Lille
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL)

Thèse de Doctorat

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille 1

***Adaptation de chimères intergénomiques 1a/2a du
virus de l'Hépatite C
et
Caractérisation d'un clone cellulaire d'hépatocyte
présentant un corps intracytoplasmique***

Dirigée par le Docteur Czeslaw Wychowski

Présentée et soutenue publiquement

le 1er décembre 2011 par :

Pierre-Yves Delavalle

Pr. Annick Pierce
Dr. Sandrine Castelain
Pr. Philippe Roingeard
Pr. Philip Meuleman
Dr. Czeslaw Wychowski

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

*A mes parents et mon frère
A mes grands-parents,
ceux qui sont partis et ceux qui restent*

A Anne.

*Rien ne vaut la recherche
lorsque l'on veut trouver quelque chose.*

John Ronald Reuel Tolkien

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier l'ensemble des membres de mon jury : le professeur Annick Pierce, sa présidente ; le docteur Sandrine Castelain et le professeur Philippe Roingard, ses rapporteurs ; le professeur Philip Meuleman, son examinateur. Merci de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

Merci à Jean, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Sans cet accueil je n'aurais pas pu réaliser mes travaux. Tu es un très bon chef de labo, toujours disponible pour parler de science, d'écologie ou de cyclisme.

Czeslaw, je vais enfin me décider à vous tutoyer ici dans ces remerciements. Mille mercis pour tout. Tout d'abord pour ton soutien inconditionnel durant ces quatre années. Pour m'avoir montré qu'il ne fallait jamais baisser les bras, et qu'au final on trouve toujours une solution. A ton contact j'ai appris beaucoup de choses, du point de vue scientifique et du point de vue humain. Je n'oublierais jamais les nombreuses discussions où nous parlions de science. Mais aussi toutes les fois où nous parlions d'autres choses : cinéma, science fiction, actualités, toujours autour d'un café après la pause repas. Et parfois avec beaucoup d'humour.

Je vais continuer avec le groupe des « mange-tard », des gens qui n'ont pas peur d'aller au restau' du campus à des heures qui mettent l'estomac à rude épreuve :

Laurence, qui me supporte le midi, mais aussi le reste de la journée dans le bureau. Toujours souriante, merci pour ta gentillesse.

André, le « master of cell culture » et le roi des anticorps. Inséparable de Czes', à l'humour complémentaire. Ça a été un plaisir de travailler avec toi.

Sophana, le pro du photoshop, combien de photos du labo n'auraient jamais dû finir entre tes mains ? Enfin c'aurait été moins drôle. Merci pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, et même des échanges Mac VS. GNU/Linux.

Julie, la fille du Père Noël (comprenez qui pourra). Tu as su reprendre la lourde tâche de Vera, à savoir nous motiver pour aller manger.

Rayan, notre portier officiel, après toutes les péripéties que tu as vécues, je te souhaite un bon début de thèse.

Merci aussi à tous les « mange-tôt », même si je ne partage pas les repas avec vous :

Yves, le pro du micro', à l'humour aiguisé ; Sandrine la chef du P2/P3 ; Nathalie la reine des pots belges, euh la reine Belge des pots ; Karin et sa molécule magique du thé vert ; Claire ma voisine de Fives.

Xavier, le « parig... », bon, j'arrête avec c'te blague. J'aurais quand même réussi à te faire faire le chat.

Noémie, mon ancienne voisine du Vieux Lille, mon ancienne voisine de bureau et de paillasse, merci pour ta bonne humeur, ton caractère et le vin jaune. Prends soin de mon bureau.

Thibaut, un autre voisin fivois, merci d'être aussi chauvin et de défendre haut et fort les couleurs du Nord ;

Merci aux nouveaux venus du labo, Ahmed, Sohail, Lucie et Yan, je n'ai peut être pas eu le temps de suffisamment vous connaître, mais la relève semble être assurée.

Merci à tous les anciens qui sont parti du labo pour d'autres aventures : David, je serai toujours ton padawan, Vera notre brésilienne préférée, Yann le technophile, François le basketteur, et Ioan qui n'est pas vraiment parti au vu des allers-retours Bucarest-Lille qu'il fait. Et plus spécialement : Gaby, Anna, Birke, et Lucie, vous avez été là pendant quasiment toute ma thèse, je n'oublierai jamais les moments que l'on a passés tous ensemble, au labo ou à l'extérieur.

Khaled, toi tu as le droit à un paragraphe rien qu'à toi. Au-delà du collègue j'ai trouvé en toi un véritable ami. Je n'oublierais pas tout le temps qu'on a passé à discuter de science et d'autres choses, tu seras toujours mon petit lap...

Et tous ceux croisés dans le labo, désolé si j'en oublie certains, Pauline, Anne, Margot, Angeline, Julien, Julien (ahah qui est qui ???), Cécile, Ngoc, Manue, Muriel, ect...

Marie-Christine, qui effectue un boulot monstre pour le labo, mais qui est toujours disponible et souriante, merci à toi.

Merci à Tian qui surveille mon alimentation, et qui me dit que je devrais ralentir sur les muffins.

Merci à mes parents, qui me soutiennent depuis toujours, sans vous rien de tout ça n'aurait été possible. Je ne vous le dirai jamais assez : merci !

À mon petit frère, parce que oui tu seras toujours le plus petit même si tu triches avec tes « cheveux du chaos ».

À mes amis, même si j'ai du mal à en voir certains, je n'oublie aucun de vous. Merci d'avoir supporté mes explications alambiquées sur ce que je faisais. Et merci d'être comme vous êtes, ne changez rien, c'est vous les meilleurs. Un clin d'œil à mes correctrices, même si malgré leurs efforts j'ai du laisser des fautes.

Un petit mot pour tous les Gentilshommes et Gentes Dames de la Brette : je suis devenu un bretteur en même temps que je suis devenu doctorant. L'escrime artistique est devenu rapidement une passion, autant qu'une soupape pour décompresser, me vider la tête, me ressourcer. La crypte, notre lieu d'entraînement est un peu devenue une seconde maison. Certains compagnons d'armes sont devenus de vrais amis (ils se reconnaîtront). Merci à vous, vous fréquenter et venir tâter le fer pendant mes années de thèse m'a fait beaucoup de bien, je ne l'oublierai jamais. « Un pour tous... »

À Anne, ma juriste à moi. Je t'ai rencontré en plein milieu de cette thèse, tu venais à la salle d'arme pour faire de l'escrime. Avec toi j'ai trouvée ma « partenaire » en escrime comme dans la vie. Tu es la meilleure chose qui me soit arrivée.

Résumé

Le virus de l'hépatite C (HCV) est un problème majeur de santé publique. On estime en effet que près de 3% de la population mondiale est infectée par ce pathogène qui se caractérise entre autre par sa grande variabilité génotypique. Les différentes souches de HCV ont été classées parmi six génotypes majeurs, eux même subdivisés en de nombreux sous-types. Toutes les souches de HCV n'ont pas la même capacité, comme JFH1 (génotype 2a), à se propager efficacement en culture cellulaire ce qui limite l'analyse des particules virales.

Pour pallier la difficulté d'étudier le HCV de génotype 1a, des chimères inter-génotypiques présentant les caractéristiques structurales du HCV de génotype 1a mais possédant le pouvoir répliatif exceptionnel de l'isolat JFH1 (génotype 2a) ont été produites. Celles ci ont été adaptées à la culture cellulaire et plusieurs mutations d'adaptation ont été identifiées. L'importance de la protéine NS5 dans la formation des particules virales infectieuses ayant été également prouvée, cela nous a conduit à générer d'autres chimères pour lesquelles les séquences codant la protéine NS5A de JFH1 étaient substituées par celles de la souche H77, nous rapprochant ainsi du HCV de génotype 1a. Cela nous a permis d'identifier d'autres mutations d'adaptation pour ces chimères, permettant ainsi d'améliorer leur infectiosité en culture cellulaire.

Par ailleurs, nous avons caractérisé une structure inédite présente au sein d'un clone de cellules d'hépatocytes (Huh-7w7.3) qui avait été sélectionné au cours d'une étude pour analyser le passage cellule à cellule des particules virales. Cette structure que nous avons dénommé SB pour « spheroid body » présente un enroulement des kératines 8 et 18 (K8/K18) emprisonné dans une cage de vimentine. Cette structure pouvant être assimilée à des inclusions cytoplasmiques, nous avons cherché alors à mieux la caractériser. Au cours de la division cellulaire nous avons remarqué que cette structure se désassemble et se réassemble pour ne recréer qu'un seul SB par cellule. Toutes nos analyses ont démontré que le SB n'est pas assimilable aux corps de Mallory (MDB) qui représentent des agrégats dans les hépatocytes. Par ailleurs, aucune mutation n'a été identifiée dans la séquence primaire des protéines K8, K18 et vimentine provenant des cellules Huh-7 et Huh-7w7.3. Cependant l'expression d'une GFP-K18 dans ces dernières conduisait à l'enroulement des filaments de kératines, contrairement à ce qui était observé dans les cellules Huh-7. En conclusion, nous avons isolé un clone cellulaire présentant un corps intra cytoplasmique tout à fait inédit impliquant des facteurs cellulaires présents dans la cellule Huh-7w7.3 et non dans celle de Huh-7.

Abstract

Hepatitis C Virus is a major public health problem, around 3% of the world population is estimated to be infected by this pathogen which is characterized by a great genotypic variability. The HCV strains have been classified within six major genotypes, subdivided in numerous subtypes. However all HCV genotypes are not able to spread efficiently in cell culture as JFH1 (HCV genotype 2a).

In order to analyse the HCV viral particles of genotype 1a, inter genotypic chimeras having the structural characteristics of HCV genotype 1a but the replicative power of JFH-1 (genotype 2a) were produced. These chimeric viruses were adapted to the cell culture and several mutations have been identified. Furthermore, the NS5A protein has been described to be important for infectious viral particle formation. This lead us to generate chimeric viruses where the sequence coding for JFH1 NS5A protein was replaced by the corresponding sequence of H77 strain. We identified a new group of mutations in the adapted viruses, allowing to increase their infectivity in cell culture.

Furthermore, a cellular clone containing an intracytoplasmic body was isolated from hepatocyte cell culture (Huh-7w7.3). This structure was named SB for “spheroid body”, and the keratins 8 and 18 (K8/K18), which formed the central core of the SB were surrounded by a vimentin cage-like structure. We examined whether this body could be related to some intracytoplasmic inclusions. During cytokinesis, the SB was disassembled and reassembled in a way to reconstitute a unique SB in each progeny cell. All our analyses indicate the SB is not related to Mallory-Denk body, a well characterized intracytoplasmic inclusion. Moreover, the structure of SB was not due to mutations in the primary sequence of K8/K18 and vimentin. However GFP-K18 expression leads to typical cytoplasmic whorls of intermediate filaments only in Huh-7w7.3 cells. In the present study, we have isolated a cellular hepatocytic clone containing an unusual cytoplasmic keratin-rich spheroid body involving cellular factors in the process of spheroid body formation.

Sommaire

Résumé.....	8
Abstract	9
Sommaire	10
Liste des abréviations.....	13
Liste des figures et Tableaux.....	17
I. INTRODUCTION.....	19
A. L'hépatite C.....	19
I. Découverte de l'agent causatif des hépatites « non-A, non-B »	19
II. Épidémiologie	19
III. Les modes de contamination	20
IV. Pathologie et Evolution de la maladie.....	21
A. L'hépatite Aiguë.....	21
B. L'hépatite Chronique.....	22
V. La réponse Immunitaire	23
A. La réponse immunitaire innée	23
B. La réponse immunitaire adaptative	25
1. La réponse immunitaire humorale.....	25
2. La réponse immunitaire cellulaire.....	27
VI. Thérapies anti-HCV	29
A. La bithérapie.....	30
B. Traitements antiviraux à venir.....	32
C. Perspectives de vaccination.....	35
B. Le virus de l'hépatite C	38
I. Classification et variabilité génomique	38
II. Propriétés biophysiques de la particule	41
III. Organisation du génome.....	42
A. Les extrémités non codantes	43
1. La région 5'UTR	43
2. La région 3'UTR	44
B. Les protéines virales.....	44
1. La protéine de Capside	45
2. La protéine F	46
3. Les protéines d'enveloppe E1 et E2.....	46
a) Organisation des protéines E1 et E2	47
b) Biogenèse et maturation des protéines E1 et E2	48
4. La protéine p7.....	49
5. La protéine NS2	50
6. La protéine NS3	52
7. La protéine NS4A.....	55
8. La protéine NS4B.....	55
9. La protéine NS5A.....	56
10. La protéine NS5B.....	59
IV. Les modèles d'étude de HCV.....	61
A. Les modèles animaux	61
B. Les modèles cellulaires	62
1. Cellules infectées par le HCV isolé de sera de patients	63
2. Les réplicons sous-génomiques et génomiques	63

3.	Pseudovirions et virosomes	65
4.	Les particules rétrovirales pseudotypées HCV	66
5.	Production de particules HCV en culture cellulaire	68
a)	Élaboration du système HCVcc	68
b)	Amélioration des HCVcc	69
c)	Chimères intergénomiques et HCVcc	70
d)	Particularités de la souche JFH-1	71
V.	Le cycle viral	72
A.	Attachement et entrée dans les hépatocytes	74
1.	Facteurs d'attachement	74
a)	Les lectines	74
b)	Les glycosaminoglycanes	74
c)	Le récepteur LDL	75
2.	Facteurs d'entrée	75
a)	Le récepteur CD81	75
b)	Le récepteur SR-BI	76
c)	La protéine de jonction serrée Claudine	77
d)	La protéine de jonction serrée Occludine	77
3.	Internalisation des particules virales	78
4.	La fusion	79
B.	La synthèse des protéines virales	80
1.	Traduction du génome viral	80
2.	Les protéines virales	81
C.	La réplication du génome viral	81
D.	L'assemblage et la sécrétion virale	82
1.	Premières étapes de l'assemblage	83
2.	Rôle des protéines non-structurales dans l'assemblage	83
3.	Rôle des lipides dans l'assemblage et la sécrétion	84
C.	Hépatocytes et filaments intermédiaires (IFs)	86
I.	Le foie : organisation et fonction	86
A.	Organisation et anatomie du foie	86
B.	Les cellules du foie	86
1.	Les hépatocytes	87
2.	Les cellules non-parenchymales	88
C.	Les différentes fonctions du foie	88
D.	Pathologies associées au foie	89
II.	Le cytosquelette	90
A.	Composants du cytosquelette	90
1.	Les microtubules	90
2.	Les filaments d'actine	91
3.	Les filaments intermédiaires (IFs)	91
B.	Fonctions et rôle du cytosquelette	91
III.	Les filaments intermédiaires (IFs)	92
A.	Composition et formation des polymères précurseurs des IFs	93
1.	Composition	93
2.	Formation des polymères	94
B.	Assemblage et modifications des IFs	96
1.	Assemblage des IFs	96
2.	Modifications post-traductionnelles des IFs	97
C.	Implication dans diverses pathologies	98

D.	Les kératines : un exemple de composant des IFs	99
1.	Diversité et classification des kératines	99
2.	Structure et caractéristiques des cytokératines.....	100
a)	Structure des cytokératines.....	100
b)	Caractéristiques des cytokératines	102
E.	Les MDBs: un exemple d'inclusion cytoplasmique	103
F.	Les MRTs : un exemple de tumeur présentant des inclusions intracytoplasmiques	105
II.	Objectifs du travail	107
A.	Construction et amélioration de chimères intergénomiques 1a/2a de HCV	107
B.	Analyse d'un clone cellulaire d'hépatocyte présentant une structure intracytoplasmique inhabituelle	108
III.	Résultats, première partie	110
A.	Introduction	111
B.	Matériel et Méthodes.....	113
I.	Culture cellulaire	113
II.	Construction des chimères	113
III.	Transcription in vitro.....	113
IV.	Electroporation	114
V.	Infections successives	114
VI.	Titration.....	115
VII.	Immunoempreinte	115
VIII.	Immunofluorescence indirecte	115
IX.	RT-PCR.....	116
X.	Quantification des équivalents génomes	116
C.	Résultats	117
I.	Construction d'une chimère 1a/2a : « S1a/2a ».....	117
II.	Identification de mutations impliquées dans l'adaptation de la chimère S1a-NS2-1a2a à la culture cellulaire.....	118
III.	Analyse des génomes viraux chimériques exprimant les différentes mutations	118
IV.	Analyse des chimères S1a/V, P et VP sans la mutation Q1251L	119
V.	La mutation Q1221K restaure l'infectiosité des chimères 1a2a	120
VI.	Substitution de la séquence NS5A de JFH1 par celle de H77.	120
VII.	Analyse des mutations d'adaptation localisées dans NS4B et NS5A	121
D.	Discussion	123
I.	Adaptation à la culture cellulaire d'une chimère virale de type 1a/2a.....	123
II.	La mutation Q1251L est compensée par la mutation Q1221K.....	125
III.	Substitution de la séquence NS5A de génotype 2a par celle de génotype 1a dans la chimère 1a2a.....	125
E.	Conclusions et perspectives	129
F.	Figures de la première partie.....	131
IV.	Résultats, second partie	141
A.	Article I	141
B.	Discussion	162
C.	Conclusions et perspectives	167
V.	Bibliographie.....	170

Liste des abréviations

A

aa : acides aminés
apo : apolipoprotéine
ATP : Adénosine Triphosphate
ARFP : Alternative Reading Frame Protein.
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNt : ARN de transfert

C

Cardif : CARD adapter inducing interferon
CD81 : Cluster Differentiation 81
CHC : carcinome hépatocellulaire
CINP : Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein
CLDN-1 : récepteur Claudine-1
CMS : Cellules Mononucléées du Sang

D

DAA : Direct Antiviral Agent
DC-SIGN : Dendritic-cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin

E

eIF : Eukaryotic initial factor
EMCV : Virus de l'encéphalomyocardite
ESCRT : Endosomal sorting complex for transport
EWI-2 : Glutamine-Tryptophane-Isoleucine
EWI-2 wint : EWI-2 without its N-terminus

F

FDA : Food and Drug Administration
FKBP8 : FK506-binding protein

G

GBF-1 : Golgi-associated brefeldin A-resistant factor 1
GFP : Green Fluorescent Protein
GL : Gouttelette Lipidique
GTP : Guanosine Triphosphate

H

HAV : Hepatitis A Virus
HBV : Hepatitis B Virus
HCV : Hepatitis C Virus
HCVcc : production de HCV en culture cellulaire
HCVpp : particules virale pseudotypée avec les protéines d'enveloppe de HCV
HCV-VLP : Hepatitis C Virus – Virus Like Particle
HIV : Human Immnuodeficiency Virus
HUGO : Organisation du Génome Humain
HVR : Hypervariable Region
Hsp : Heat shock protein
hVAP: Human vesicle-associated membrane protein associated protein

I

IF : filament intermédiaire
IFAP : protéine associée aux filaments intermédiaires
IFN : Interféron
INI1 : Integrase interactor 1
IRES : Internal Ribosome Entry Site
ISDR : IFN Sensitivity Determining Region

J

JAK-STAT : Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription

K

K : Kératine
Kb : Kilo base pair (soit 1000 bases pair)
kDa : Kilo Dalton (soit 1000 Dalton)

L

L-SIGN : Liver/Lymph node-specific ICAM-3 grabbing non-integrin
LDL : Low Density Lipoprotein
LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor
LTR : Long terminal repeat

M

MAPS : Microtubule Associated Proteins
MAVS : Mitochondrial antiviral signaling
MDB : Mallory-Denk Body
MLV : Murine Leukemia Virus
MTP : Protéine microsomale de transfert

N

NANBH : Non-A Non-B Hepatitis (Hépatite Non-A Non-B)
NI : Nucleosidic inhibitor
NNI : Non-Nucleosidic inhibitor
NK : Natural Killer
NTP : Nucleoside Triphosphate

O

OAS : 2',5'-oligoadenylate synthetase
OCLN : protéine de jonction serrée Occludine
O-GlcNac : O-N-acetylglucosamine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame

P

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Polyéthylène-glycol
PEG-IFN : Interféron couplé au Polyéthylène-glycol
PKR : Protéine Kinase R
PPAR- γ : Peroxisome proliferators-activated receptors-gamma

R

RE : Réticulum Endoplasmique
RdRp : RNA dependent RNA polymerase
RIG-I : Retinoïc Acid Inducible Gene I
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S

SDS-PAGE : Sodium dodécyl-sulfate Poly-acrylamide Gel Electrophoresis
SFV : Virus de la forêt de Semiliki
siRNA : Small interfering RNA
SNF5 : Sucrose Non-fermenting gene number 5
SRBI : Scavenger Receptor Class B type I
STAT-C : Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV

T

TMD : Domaine Transmembranaire
TLR : Toll Like Receptor
TRIF : Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor Inducing Interferon

U

ULF : Unit-Lenght Filament
UTR : Untranslated Region

V

VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VLP : Virus Like Particle
Vsp4 : Vacuolar protein sorting-associated protein 4
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

Y

YB-1 : Y-Binding 1

Liste des figures et Tableaux

Figure 1 : Prévalence de HCV dans le monde.	20
Figure 2 : Évolution d'une hépatite causée par HCV.....	22
Figure 3 : Perturbation des différentes voies de production de l'IFN par le HCV.	25
Figure 4 : Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par HCV.....	28
Figure 5 : Evolution du traitement contre l'Hépatite C.....	31
Figure 6 : Efficacité des différents traitements thérapeutiques en fonction des génotypes infectants.	32
Figure 7 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae.....	38
Figure 8 : Arbre phylogénétique du virus de l'Hépatite C.....	39
Figure 9 : Répartition mondiale des différents génotypes de HCV	40
Figure 10 : Représentation schématique d'une particule de HCV	41
Figure 11 : Organisation génomique du Virus de l'Hépatite C.....	43
Figure 12 : Les protéines de HCV et leur association avec la membrane du RE.....	45
Figure 13 : Représentation schématique des glycoprotéines E1 et E2.....	49
Figure 14 : Structure 3D de la protéine NS2.....	51
Figure 15 : Structure 3D du domaine protéase de NS3 en complexe avec NS4A et un peptide.	53
Figure 16 : Structure 3D de la partie Hélicase de NS3 et son mécanisme de fonctionnement.....	54
Figure 17 : Représentation de la topologie de NS4B	55
Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines de NS5A et des fonctions qui y sont associées.	57
Figure 19 : Présentation de la polymérase NS5B de HCV.	60
Figure 20 : Représentation schématique de réplicons de HCV.....	64
Figure 21 : Représentation schématique de la production de HCVpp.....	67
Figure 22 : Représentation schématique du principe de production de HCVcc.	69
Figure 23 : Représentation schématique du cycle viral de HCV	73
Figure 24 : Représentation schématique de l'entrée de HCV dans ses cellules cibles	79
Figure 25 : Modèle d'assemblage des particules virales de HCV.....	85
Figure 26 : Représentation schématique de l'organisation du foie	87
Figure 27 : Représentation schématique de l'organisation des différents polymères pouvant constituer les IFs.....	95
Figure 28 : Représentation schématique des trois phases d'assemblage des IFs.	96
Figure 29 : Représentation schématique de la structure des kératines.....	101
Figure 30 : Représentation schématique de l'organisation des desmosomes.....	166
Tableau 1 : Nouvelles molécules STAT-C en cours d'étude clinique.	34
Tableau 2 : Différents vaccins anti-HCV en cours d'études clinique.....	37
Tableau 3 : Récapitulatif des différentes classes de IFs.....	94
Tableau 4 : Récapitulatif des protéines composant les MDBs.....	103

Introduction

I. INTRODUCTION

A. L'hépatite C

I. Découverte de l'agent causatif des hépatites « non-A, non-B »

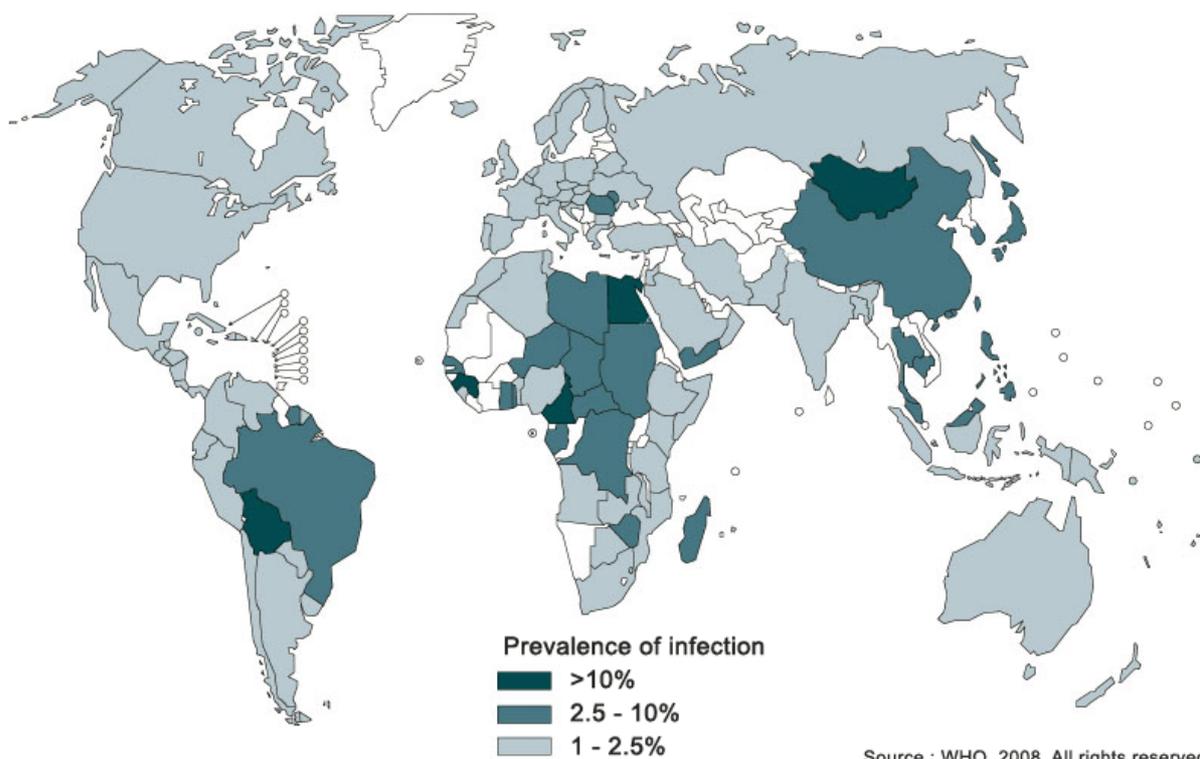
A la fin des années 1960 et au début des années 1970, deux agents viraux responsables des hépatites ont été identifiés : les virus des hépatites A et B (HAV et HBV). Cependant, les tests sérologiques utilisés à l'époque ont révélé l'existence d'autres virus capables de provoquer une hépatite. Ces hépatites furent désignées sous le nom d'hépatites « Non-A, Non-B » (NANBH) (Feinstone et al, 1975; Prince et al, 1974) Par la suite les études menées sur le chimpanzé ont permis d'identifier l'une des entités virales responsable d'une hépatite « Non-A, Non-B », à savoir un virus de diamètre compris entre 30 et 60 nm possédant une enveloppe lipidique (Bradley et al, 1983; Bradley et al, 1981; Feinstone et al, 1983; He et al, 1987). Puis l'équipe de Michael Houghton identifia l'agent responsable de l'hépatite « Non-A, Non-B » post-transfusionnelle, grâce à l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (Choo et al, 1989). Le séquençage du génome de cet agent pathogène le classe au sein de la famille des *Flaviviridae*. Il fut appelé virus de l'Hépatite C (HCV).

II. Épidémiologie

L'Hépatite C est un problème majeur de santé publique. L'infection, répartie à l'échelle mondiale, est une cause majeure d'hépatite aigüe, évoluant souvent vers la chronicité, voir le carcinome hépatocellulaire. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime la prévalence de cette maladie entre 2,2 et 3%, ce qui représente de 150 à 200 millions de personnes, selon les dernières évaluations (Lavanchy, 2009).

La prévalence du HCV peut varier énormément entre deux régions du globe (voir Figure 1), cependant les valeurs les plus élevées sont retrouvées dans les pays du Sud économique. Elle avoisine ainsi les 5% dans les pays d'Afrique et en Méditerranée orientale, et elle atteint 15 à 20% en Egypte, le pays qui présente la plus haute prévalence mondiale. Au contraire les valeurs les plus faibles sont enregistrées dans les pays du Nord économique (Lavanchy, 2009; Shepard et al, 2005). Elle se situe par exemple entre 0,01 et 1% au Royaume Uni et en Scandinavie, elle avoisine les 1,8% dans les Etats-Unis d'Amérique, et est estimée à 1,1% en France (Dubois et al, 1997).

Hepatitis C, 2007



(D'après l'O.M.S 2008)

Figure 1 : Prévalence de HCV dans le monde.

III. Les modes de contamination

Le mode de transmission de HCV est la voie parentérale : c'est-à-dire qu'il se transmet par le sang et ses dérivés (Lavanchy, 2009). Ainsi la transfusion sanguine était, jusqu'en 1990, le mode principal de contamination dans les pays du Nord. Par la suite la mise en place de nombreuses méthodes préventives ont fait diminuer très fortement le risque d'hépatites post-transfusionnelles (Alter, 2007; Shepard et al, 2005). Une de ces mesures la plus récente est la mise en place du dépistage génomique viral de HCV par RT-PCR sur tous les dons de sang depuis 2001 (Pillonel & Laperche, 2005). De nos jours le risque résiduel est estimé à 1 pour 6,5 millions (Rebibo & Danic, 2007). Toutefois un risque élevé subsiste dans les pays du Sud, la principale cause étant un manque de moyens de contrôles lors des dons de sang (Shepard et al, 2005).

Dans les pays du Nord, le risque majeur est désormais lié à l'utilisation de drogues intraveineuses. En effet, le HCV peut être transmis lors des échanges de seringues, mais également par le partage de matériel annexe lié à la consommation de drogue.

Il existe par ailleurs un risque de contamination chez les professionnels de santé, principalement dû à des piqûres accidentelles avec des aiguilles contaminées (Yazdanpanah et

al, 2005). Ce danger peut être diminué en évitant les gestes à risque et en suivant avec précautions les consignes de désinfections et de prophylaxie en cas d'exposition accidentelle.

Les contaminations nosocomiales constituent également une source d'infection par HCV. Elles dépendent principalement de l'utilisation de matériel médical mal décontaminé, ou sont liées à des injections thérapeutiques et/ou des transfusions sanguines réalisées dans de mauvaises conditions d'asepsie. Cependant, un meilleur respect des règles d'hygiène et des recommandations de désinfection du matériel médical non-jetable, ainsi que le développement du matériel à usage unique ont permis de réduire de manière significative ce risque .

D'autres modes de contamination ont été décrits ; ils concernent certaines pratiques religieuses, cosmétiques ou culturelles (tatouages, piercings, circoncision, acupuncture, etc...). Enfin les transmissions par voix materno-fœtale, sexuelle, ou familiale sont possibles mais restent relativement peu fréquentes (Alter, 2007; Shepard et al, 2005).

IV. Pathologie et Evolution de la maladie

L'hépatite C est une maladie évolutive. En effet les personnes infectées développent une hépatite aiguë qui si elle ne se guérit pas va évoluer lentement vers une hépatite chronique. Par la suite la maladie pourra conduire au développement d'une cirrhose, et dans le pire des cas à un carcinome hépatocellulaire (voir Figure 2). L'évolution de cette maladie peut être influencée par des facteurs divers tels que l'âge et le sexe. La co-infection par d'autre virus comme le HBV ou le HIV (Virus de l'immunodéficience Humaine) peuvent être des facteurs aggravants, de même qu'une consommation élevée d'alcool ou d'autres atteintes hépatiques présentes avant l'infection par HCV.

A. L'hépatite Aiguë

L'infection par HCV entraîne une hépatite aiguë, la plupart du temps asymptomatique (Maheshwari et al, 2008). Elle se caractérise par l'apparition de marqueurs biologiques, détectables dans le sang des patients infectés. Ainsi la présence de l'ARN viral commence à être détectée entre 1 et 3 semaines post-contamination (Farci et al, 1991). L'activité des alanines aminotransférases augmente (jusqu'à plus de 10 fois la concentration normale), le pic d'activité apparaissant entre 2 et 4 semaines après le contact avec HCV. Enfin la séroconversion intervient souvent dans les 6 à 8 semaines après l'infection (Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Chung, 2005).

L'hépatite aiguë causée par HCV, si elle est asymptomatique dans la majorité des cas, entraîne cependant pour près de 20% des patients des symptômes passagers dont l'apparition coïncide avec l'élévation des transaminases sériques. Les symptômes classiquement observés sont : fatigue, fièvre, nausées, douleurs abdominales, coloration sombre de l'urine et ictère cutanéomuqueux (Maheshwari et al, 2008).

Le pourcentage de guérison spontanée, définie par l'absence durable de l'ARN viral dans le sang des patients, varie entre 15 et 30%. Généralement les patients résolvant l'infection avaient une hépatite aiguë avec une virémie faible ; de plus, être de sexe féminin, ou atteint par une souche HCV de génotype 3 semble favoriser cette guérison spontanée (Bakr et al, 2006; Lehmann et al, 2004). Corrélativement, 70 à 85% des personnes infectées par HCV évoluent vers une hépatite chronique (voir Figure 2). Enfin certains cas d'hépatite fulminante ont été rapportés, mais ceux-ci restent extrêmement rares (Farci et al, 1996a).

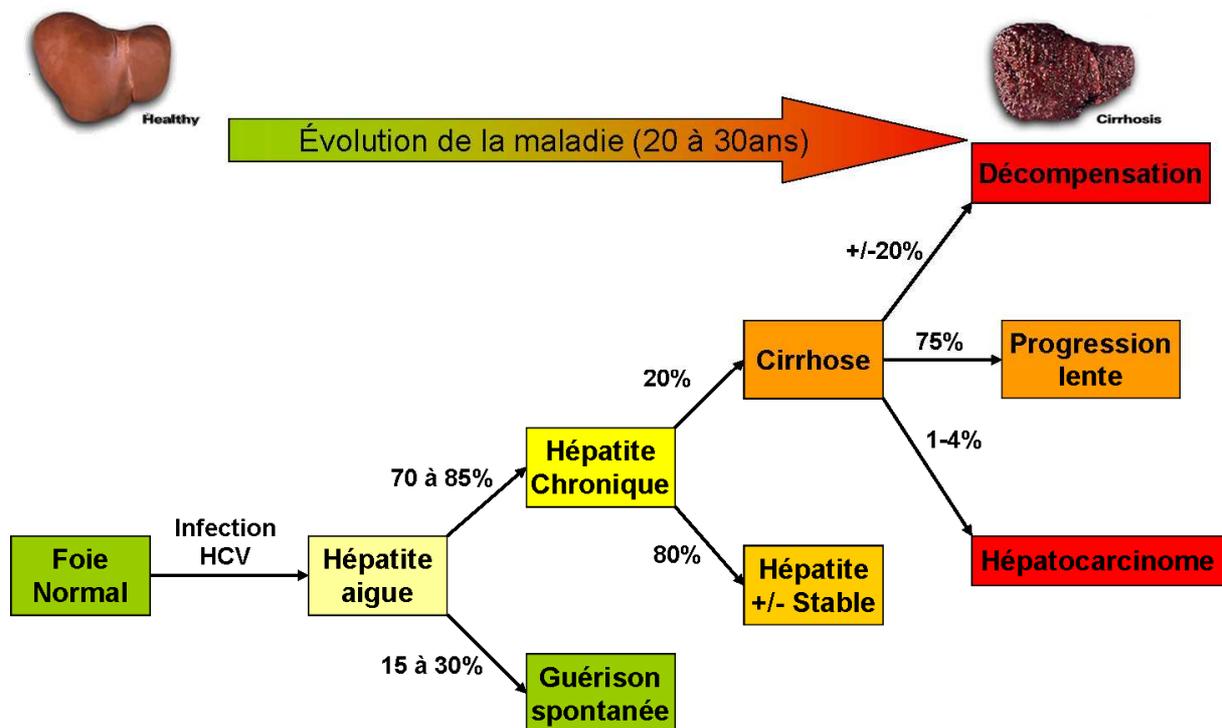


Figure 2 : Évolution d'une hépatite causée par HCV.

B. L'hépatite Chronique

Le passage à la chronicité de l'hépatite C est caractérisé par la persistance de la réplication virale et la présence durable de l'ARN viral dans le sérum des patients (Barrera et al, 1995), plus de 6 mois après l'infection. Cette évolution est dépendante et influencée par

plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, le mode de contamination initial, la consommation d'alcool, ou la co-infection par HIV ou HBV (Vaquer et al, 1994).

La forme chronique de l'hépatite C est diagnostiquée par sérologie et par recherche de la présence d'ARN viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Ce diagnostic peut être éventuellement complété par une analyse histologique. Celle-ci permet d'évaluer l'état d'avancement de la maladie et d'obtenir un pronostic médical (Hoofnagle, 2002).

L'hépatite C chronique peut durer plusieurs décennies. Cette infection peut être asymptomatique, ou s'accompagner de symptômes comprenant : fatigue, irritabilité, douleurs abdominales, articulaires ou musculaires, anorexie, nausées (Lang et al, 2006). La chronicité de cette maladie entraîne diverses complications comme la stéatose, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (Yano et al, 1996).

L'évolution de la maladie est plutôt lente, et on estime qu'après 20 à 30 ans, près de 20% des malades chroniquement infectés développent une cirrhose. Le risque de développer un carcinome hépatocellulaire par la suite est de 1 à 4% par an (Tsukuma et al, 1993) (voir Figure 2).

V. La réponse Immunitaire

Le virus de l'hépatite C provoque une réponse immunitaire chez son hôte, comme c'est le cas pour tout pathogène pénétrant dans un organisme humain. Suite à l'infection, un engrenage de différents événements se produit parmi les différents acteurs de la réponse immunitaire. La première ligne de défense est constituée par les cellules Natural Killer (NK), qui sont activées. Ceci génère un état antiviral conduisant à la production de cytokines antivirales. Les cytokines activent alors les cellules présentatrices d'antigènes, ce qui entraîne ensuite la stimulation d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire en activant la différenciation des lymphocytes B et T.

A. La réponse immunitaire innée

Pendant l'infection aiguë, la première défense que le système immunitaire mobilise est la réponse immunitaire innée. Celle-ci s'appuie d'une part sur l'activation des cellules Natural Killer (NK), et d'autre part sur la sécrétion de protéines à action antivirale, comme l'interféron (IFN) de type I.

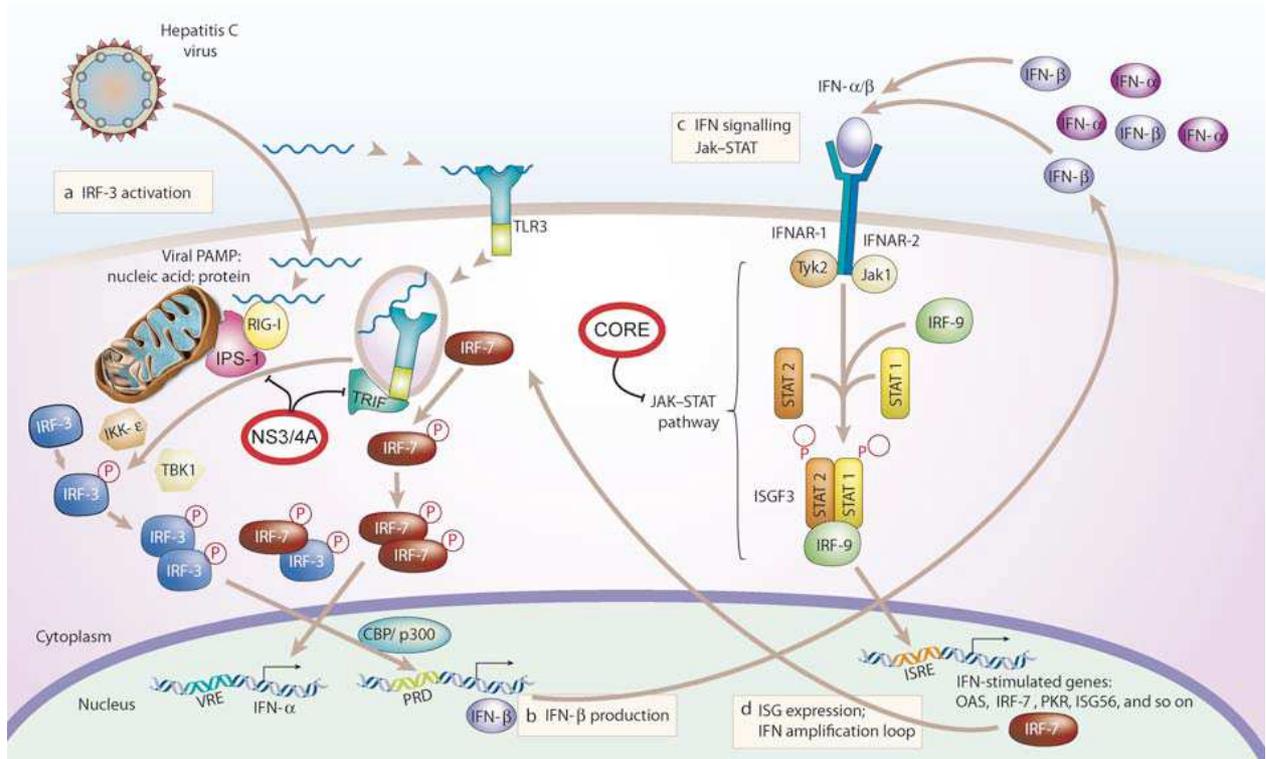
Les cellules NK jouent un rôle important par leur activité cytotoxique, ainsi que pour la production de cytokine. Une altération de l'activité de ces cellules a été proposée comme l'un des mécanismes contribuant à la persistance de l'infection par HCV. Des travaux ont

montré que l'interaction entre des protéines E2 recombinantes et le récepteur CD81, présent à la surface des cellules NK, inhibe le fonctionnement de ces cellules (Tseng & Klimpel, 2002). Néanmoins, l'utilisation de virus infectieux, produits en culture cellulaire, n'a pas permis de confirmer ces résultats (Yoon et al, 2009).

Par ailleurs, il a été observé que chez les patients chroniquement infectés, les récepteurs présents à la surface des cellules NK sont sous-exprimés, ce qui perturbe leur activité cytolytique et contribue, au final, à la persistance du virus (Nattermann et al, 2006).

En parallèle, au niveau des cellules infectées, la première réaction est la production de l'IFN β . Deux récepteurs sont responsables de l'initiation de cette production : TLR-3 et RIG-I. TLR-3 reconnaît l'ARN double brin au niveau des endosomes (Wang et al, 2009), alors que RIG-I est capable de reconnaître les régions structurées en 5' et 3' de l'ARN de HCV (Saito et al, 2008; Sumpter et al, 2005). L'activation de ces deux récepteurs provoque une cascade de signalisations cellulaires amenant à la production et à la sécrétion d'IFN β . Puis, la fixation de l'IFN sur ses récepteurs active la voie de signalisation JAK-STAT, ce qui engendre l'expression de plusieurs centaines de gènes parmi lesquels OAS, PKR et différentes cytokines. Tous ces événements ont pour résultat la mise en place d'un état antiviral aussi bien dans les cellules infectées que dans les cellules non-infectées (Feld & Hoofnagle, 2005).

Néanmoins l'effet antiviral que provoque l'IFN peut être contourné par le virus, au moyen de plusieurs mécanismes impliquant les protéines de HCV (Figure 3). Tout d'abord la protéine de capsid est capable de réguler la voie de signalisation JAK-STAT sous certaines conditions (Hosui et al, 2003). Mais elle possède également une action antagoniste à celle de l'IFN α (Bode et al, 2003). La protéase NS3/4A peut également perturber la réponse immunitaire innée. Il a été montré que cette protéase était capable de cliver les protéines Cardif et TRIF, toutes deux nécessaires à la transduction du signal dans les voies de signalisation de RIG-I et TLR-3, bloquant alors ces deux voies (Li et al, 2005a; Li et al, 2005b; Wang et al, 2009). Enfin la protéine NS5A est connue pour inhiber l'activité de la protéine Kinase R (PKR), ce qui perturbe la réponse antivirale liée à la présence d'ARN double brin dans le cytoplasme (Pflugheber et al, 2002). De plus cette protéine virale peut également induire la production d'interleukine 8, qui interfère avec la réponse antivirale induite par l'IFN.



(d'après (Lemon et al, 2007))

Figure 3 : Perturbation des différentes voies de production de l'IFN par le HCV.

- (a) HCV exprime un profil moléculaire associé au pathogène (viral PAMP), ce qui active différentes voies de signalisations par l'intermédiaire de RIG-I et TLR-3, des récepteurs de PAMP.
- (b) IRF-3 activé, ainsi que d'autres facteurs de transcription, stimulent la production d'IFN β .
- (c) L'IFN β interagit avec les récepteurs de l'IFN de type I à la surface des cellules, ce qui conduit à l'activation de la voie JAK-STAT.
- (d) L'induction des gènes stimulés par l'IFN (ISG) initie des actions antivirales et entraîne une amplification du signal grâce à la synthèse d'IFN α . La protéase NS3/4A altère l'activation des voies de RIG-I et du TLR-3 en clivant les protéines IPS-1 (encore appelée Cardif ou MAVS) et TRIF. La protéine de capsid (Core) interfère avec la voie de signalisation JAK-STAT.

B. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative fait suite à la réponse immunitaire innée. Quelques semaines s'écoulent avant la mise en place de cette réponse adaptative. Comme pour d'autres infections, la réponse immunitaire adaptative dirigée contre HCV fait intervenir des composants humoraux et cellulaires. La production d'anticorps anti-HCV par les lymphocytes B caractérise la réponse humorale. La réponse cellulaire est quand à elle caractérisée par le développement de lymphocytes T spécifiques de HCV.

1. La réponse immunitaire humorale

L'infection par HCV induit la production d'anticorps dirigés contre les protéines virales. Ces anticorps sont détectables quelques semaines après l'infection. La présence d'anticorps neutralisants est détectable au sein des séra de patients infectés par HCV.

Cependant, les études sur les anticorps neutralisants anti-HCV ont longtemps souffert de l'absence d'un système efficace de propagation du HCV en culture cellulaire. Le développement des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe de HCV a ouvert de nouvelle possibilité pour ce type d'études (Bartosch et al, 2003a; Bartosch et al, 2003b; Lavillette et al, 2005a; Lavillette et al, 2005b).

Les anticorps neutralisants ciblent les protéines d'enveloppe présentes à la surface des virions. La région HVR1 de la protéine E2 est une cible privilégiée des anticorps neutralisants anti-HCV, mais ils sont généralement spécifiques à un nombre limité d'isolats (Farci et al, 1996b). De fait, le fort taux de mutation de cette région entraîne l'émergence de quasi-espèces capables d'échapper à la neutralisation. Certaines études décrivent des anticorps anti-HCV neutralisants ciblant des épitopes en dehors de la région HVR1 et possédant un plus large spectre d'action (Keck et al, 2007; Meunier et al, 2005). L'explication en est la suivante : il semble que dans les premiers temps de l'infection les anticorps neutralisants produits sont principalement dirigés contre HVR1. Ce n'est que plus tardivement qu'apparaissent des anticorps neutralisants à plus large spectre, et dirigés contre d'autres régions de E2 (von Hahn et al, 2007).

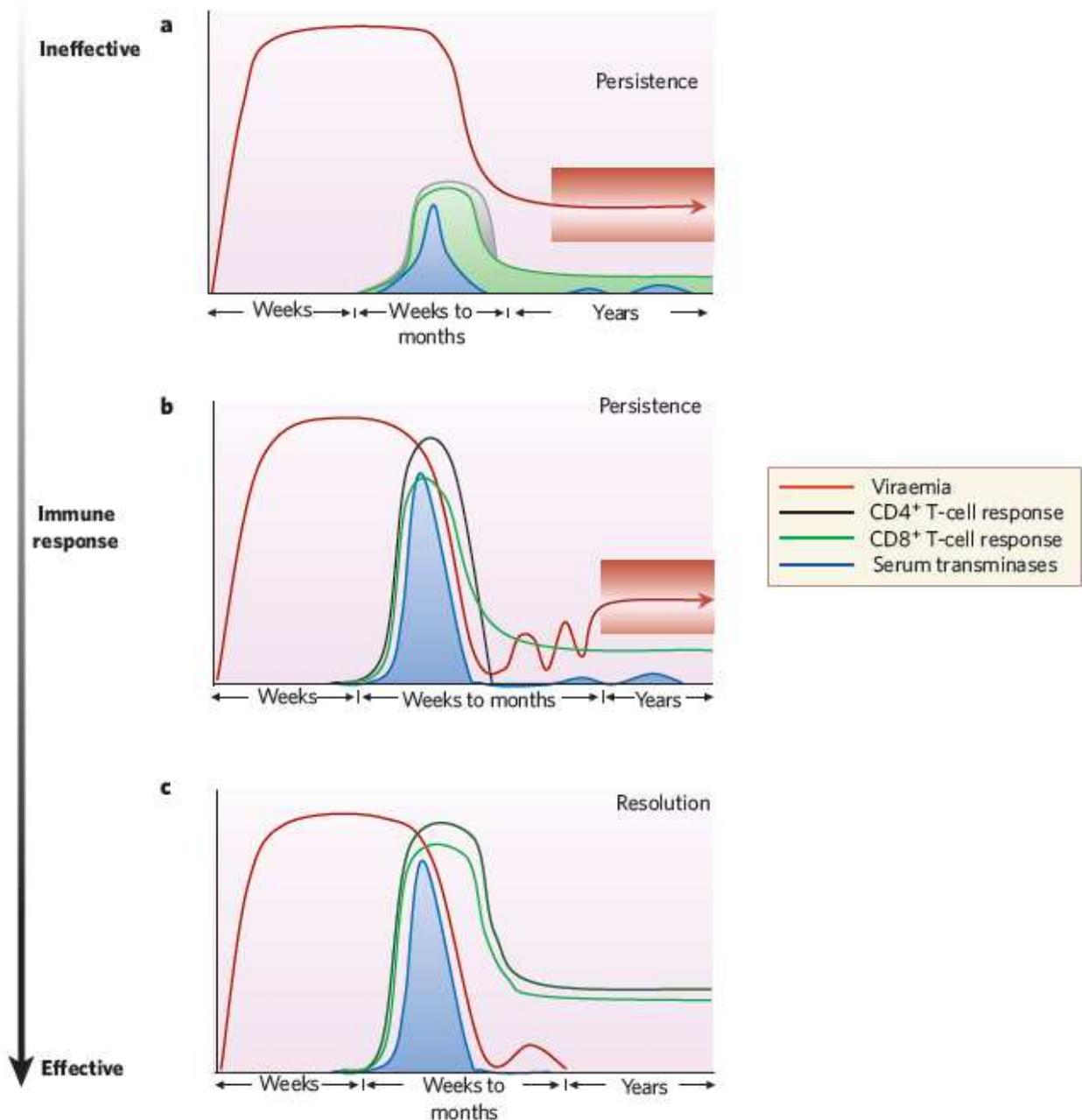
Certaines études montrent qu'une induction de la production des anticorps neutralisants au niveau de la phase précoce de l'infection permet de la résoudre (Lavillette et al, 2005a; Pestka et al, 2007). Toutefois, des cas de résolution spontanée de l'infection, sans production d'anticorps neutralisants, ont été également décrits (Logvinoff et al, 2004; Post et al, 2004). Des études ont cependant montré que le fait d'avoir résolu une infection HCV grâce à des anticorps neutralisants ne protégeait pas d'une réinfection avec des souches homo ou hétérologues (Farci et al, 1992; Lai et al, 1994). Enfin des anticorps neutralisants ont été trouvés dans le sérum de certains patients chroniquement infectés. Ces différents constats remettent en question le rôle des anticorps neutralisants dans la clairance virale, et plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer ces phénomènes. Tout d'abord, l'apparition de mutants d'échappements à la neutralisation par ces anticorps, de même que la présence de différentes quasi-espèces virales au sein d'un individu infecté, sont une première piste pour expliquer ce phénomène (Farci et al, 1996b; von Hahn et al, 2007). Ensuite, l'interaction entre les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les glycoprotéines d'enveloppe de HCV permettrait de protéger le virus de la neutralisation en facilitant son entrée dans les cellules (Bartosch et al, 2005; Dreux et al, 2006; Voisset et al, 2006). Il a été également montré que certains glycanes à la surface de E2 protègent HCV des anticorps neutralisants (Helle et al,

2007). Enfin, certains anticorps non-neutralisants pourraient, en s'attachant aux virions, empêcher la neutralisation (Zhang et al, 2007).

2. La réponse immunitaire cellulaire

Lors de la mise en place de la réponse immunitaire innée, des cytokines sont produites. Celles-ci activent les cellules dendritiques, et autres cellules présentatrices d'antigènes, ce qui enclanche dans un second temps la réponse immunitaire adaptative, et faire intervenir les lymphocytes T auxiliaires CD4+ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Cette réponse cellulaire est essentielle pour lutter contre l'infection, et elle est associée à la résolution de celle-ci (Lechner et al, 2000; Thimme et al, 2001) (Figure 4).

Durant la phase aiguë de l'infection par HCV, la réponse cellulaire CD4+ est détectable dans le sang entre 3 et 4 semaines après contamination. Elle reflète souvent une inflammation hépatique et est associée à l'élévation du taux de transaminase sérique. L'évolution de l'infection dépend de la qualité de la réponse cellulaire CD4+ anti-HCV. Ainsi, la clairance de l'infection au cours de la phase aiguë est associée à une réponse cellulaire CD4+ forte, rapide et soutenue, durant plusieurs années (Takaki et al, 2000) (Figure 4). A contrario, une réponse faible, retardée, ou transitoire, est caractéristique des patients développant une infection chronique (Gerlach et al, 1999). Cette réponse cellulaire CD4+ est dirigée principalement contre les protéines non-structurales de HCV (Hoffmann et al, 1995), et notamment NS3 qui est connue pour être très immunogène (Diepolder et al, 1997).



(D'après (Bowen & Walker, 2005))

Figure 4 : Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par HCV.

(a) La virémie (courbe rouge) augmente rapidement et, bien qu'elle diminue après le 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+ (courbes 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 cellulaire 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.

La réponse cellulaire CD8+ est également importante pour la clairance de l'infection par HCV. L'intervalle de temps entre la contamination par le virus et la détection de cette réponse cellulaire est variable. Les patients parvenant à éliminer rapidement le virus présentent en général une réponse T CD8+ vigoureuse et multispécifique, pouvant cibler entre 8 et 12 épitopes différents (Gruner et al, 2000; Lechner et al, 2000) (Figure 4). La sélection de ces épitopes conditionne la clairance virale, ou l'échappement de HCV à la réponse immunitaire. Ainsi la clairance virale sera favorisée par une sélection d'épitopes dans les protéines NS3 et NS5B, alors que l'échappement sera caractérisé par une sélection d'épitopes localisés sur d'autres protéines de HCV (Ward et al, 2002). De plus il existe une corrélation directe entre le nombre de lymphocytes T CD8+, spécifiques à HCV et producteurs de l'IFN, et la résolution de l'infection dans les 6 mois suivant la contamination (Gruner et al, 2000). Ainsi, la réponse immunitaire CD8+ contribue à la clairance de l'infection par HCV grâce à des mécanismes cytolytiques et non-cytolytiques (Lechner et al, 2000). Enfin il semble que durant l'infection chronique un équilibre se crée entre la réplication virale et l'intensité de la réponse lymphocytaire T CD8+ (Figure 4).

La réponse immunitaire cellulaire joue donc un rôle essentiel dans l'évolution de l'infection par HCV. Cependant, la contribution relative des cellules CD4+ et CD8+ dans la clairance de l'infection n'est pas clairement identifiée, mais il est établi que ces deux populations sont essentielles dans ce mécanisme (Bowen & Walker, 2005). Il a été montré que le dysfonctionnement de ces cellules entraîne une évolution de la maladie vers la chronicité ainsi qu'une persistance virale. L'absence de réponse CD4+ permet donc l'émergence de mutants d'échappement à la réponse T CD8+. Ceci démontre que les T CD8+ assurent l'immunité protectrice, mais que l'aide des CD4+ est essentielle à ce niveau (Grakoui et al, 2003). Par ailleurs, un dysfonctionnement des T CD8+, que ce soit s'agissant de leur capacité à proliférer, à sécréter des cytokines, ou à jouer leur rôle cytotoxique, peut également expliquer l'échappement de HCV à ce type de réponse immunitaire (Neumann-Haefelin et al, 2005).

VI. Thérapies anti-HCV

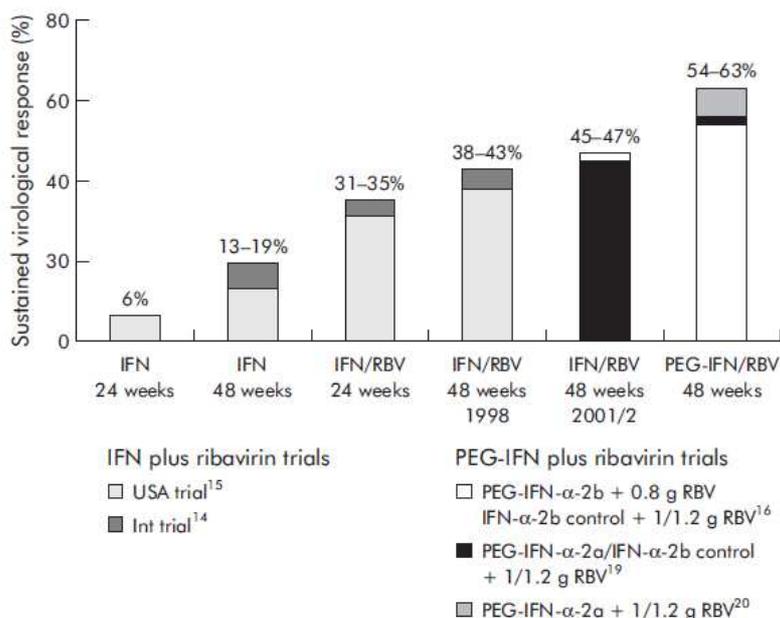
A l'heure actuelle il n'existe aucun vaccin contre le virus de l'Hépatite C. Le seul traitement disponible est une bithérapie basée sur l'utilisation conjointe d'interféron α pegylé en association avec la ribavirine. Néanmoins, ce traitement possède une efficacité limitée et dépendante de la souche virale infectante. La transplantation hépatique peut s'avérer nécessaire lorsque la cirrhose atteint un stade avancé. Toutefois, les différentes études

effectuées pour parvenir à une meilleure compréhension du cycle viral et des protéines de HCV ont permis la découverte de différentes cibles thérapeutiques. C'est ainsi que de nombreuses molécules anti-HCV assez prometteuses sont en cours d'étude, et à différentes phases d'essais cliniques.

A. La bithérapie

Avant que le HCV ne soit clairement identifié, il avait été observé que les patients atteints d'hépatite « Non-A, Non B », et traités par l'IFN, pouvaient constater une normalisation de leur taux de transaminases sériques ainsi qu'une amélioration des lésions hépatiques. L'IFN amené de manière exogène induit probablement des mécanismes antiviraux analogues à ceux causés par la sécrétion d'IFN endogène. Il a été démontré que dans le cas de HCV, l'IFN peut être à l'origine d'une diminution de la charge virale, à l'induction d'un état antiviral pour les cellules non-infectées, et à une augmentation de l'activité cytotoxique visant les cellules infectées (Feld & Hoofnagle, 2005).

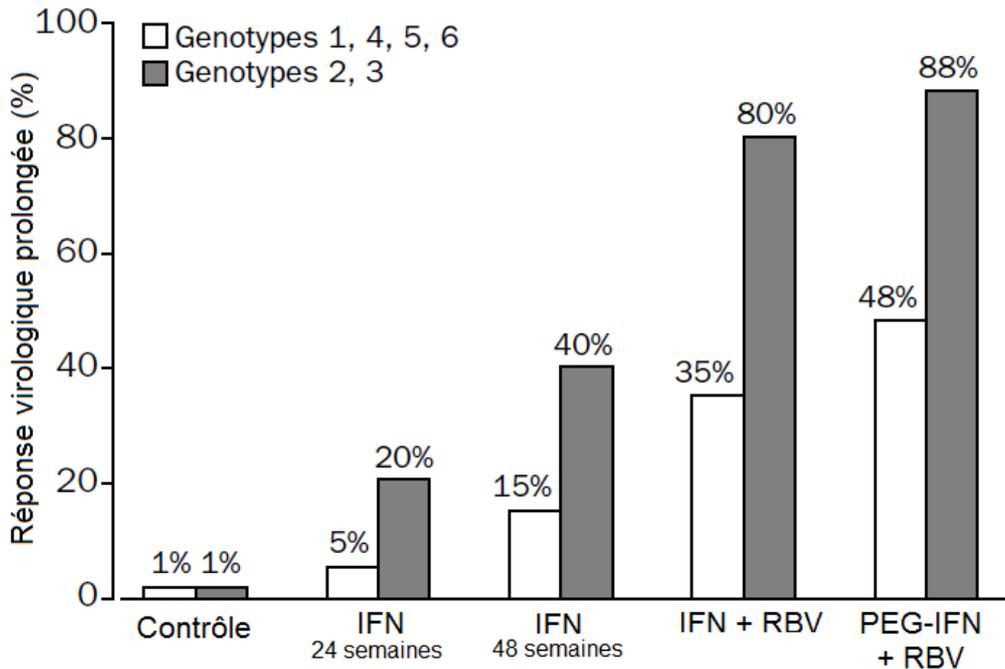
La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine, et elle possède une action sur de nombreux virus. Deux effets de la ribavirine sont à l'origine de son activité antivirale : d'une part un effet immunomodulateur et d'autre part un effet antiviral direct (Lau et al, 2002). L'effet antiviral joue directement sur la réplication de HCV en déplaçant le stock de GTP intracellulaire d'une part, et en inhibant directement la polymérase virale d'autre part (Vo et al, 2003). La ribavirine seule induit surtout une baisse significative des transaminases sériques (Feld & Hoofnagle, 2005).



(d'après (Manns et al, 2006))

Figure 5 : Evolution du traitement contre l'Hépatite C.

De nos jours, le traitement contre l'hépatite C est une bithérapie basée sur l'utilisation conjointe d'IFN α pegylé et de ribavirine (Figure 5). La conjugaison de l'IFN α avec le polyéthylène-glycol (PEG) augmente sa durée de demi-vie plasmatique. Ceci a permis de réduire la fréquence des injections, de diminuer les effets secondaires et d'augmenter *in fine* l'efficacité clinique du traitement (Davis & Lindsay, 2005). En général, cette bithérapie est administrée pendant 6 à 12 mois, en fonction du génotype infectant les patients. Pour ce qui est des génotypes 2 et 3, le traitement ne dure que 6 mois, alors que pour les génotypes 1, 4, 5 et 6, il s'étale sur 1 an (Figure 6). L'efficacité du traitement est constatée par l'absence d'ARN viral dans le sérum du patient, 6 mois après la fin du traitement (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Toutefois l'efficacité de ce traitement varie également en fonction du génotype infectant, située entre 40 et 50% pour les génotypes 1, 4, 5 et 6, et qui peut atteindre 80% pour les patients infectés avec les génotypes 2 ou 3 (Poynard et al, 2003).



(Adapté d'après (Poynard et al, 2003))

Figure 6 : Efficacité des différents traitements thérapeutiques en fonction des génotypes infectants.

Même si l'efficacité de ce traitement est limitée, l'hépatite C demeure une des seules infections virales chroniques pouvant être curée par des antiviraux. Toutefois les effets secondaires liés à ce traitement, long et coûteux, sont assez lourds. On trouve parmi ceux-ci : le syndrome grippal, la migraine, les nausées, l'irritabilité, la perte de poids, la fatigue et la dépression, ce qui peut entraîner l'arrêt du traitement pour certains patients.

B. Traitements antiviraux à venir

A l'heure actuelle, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux composés antiviraux est un enjeu majeur. De fait, comme nous l'avons vu précédemment, les traitements disponibles possèdent une efficacité limitée, ils doivent être administrés sur des périodes assez longues, et ils présentent de nombreux effets secondaires. Différentes molécules sont actuellement testées en phase clinique (Tableau 1).

Pour améliorer l'efficacité des traitements existants, de nouvelles approches ont été élaborées. Tout d'abord on citera l'Albuferon α , qui consiste en une fusion de l'IFN α avec l'albumine. Cette forme est aussi efficace que le PEG-IFN α , mais possède une durée de demi-vie plasmatique plus longue et ne nécessite plus qu'une administration toutes les deux à quatre semaines (Nelson et al, 2010; Zeuzem et al, 2008). Une autre molécule, améliorant l'efficacité du traitement existant, est la viramidine. Ce composé est un précurseur de la ribavirine, et possède la même activité anti-virale mais sans l'effet hémolytique (Marcellin et

al, 2010). En parallèle, différentes molécules possédant une activité antivirale spécifique contre HCV (STAT-C) ont été élaborées (Tableau 1).

Nous pouvons aborder des antiviraux agissant spécifiquement contre la protéase du virus, perturbant ainsi la maturation de la polyprotéine de HCV. De nombreux composés ciblant la protéase virale NS3 sont en cours d'étude, et la phase 2 des tests est atteinte pour certains. A cela nous ajouterons le Telaprevir et le Boceprevir, qui ont tous deux franchi la phase 3 de tests cliniques. Récemment la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé leur commercialisation aux États-Unis (FDA, 2011a; FDA, 2011b), le reste des pays devrait suivre dans les mois à venir. Ces composés agissent tout deux sur le site actif de NS3, bloquant ainsi l'activité protéasique de cette protéine (McHutchison et al, 2010; Sakamoto & Watanabe, 2009). C'est la première fois dans l'histoire de l'hépatite C qu'un agent antiviral direct (DAA) va être utilisé en thérapie.

Une autre cible thérapeutique intéressante est l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) ou NS5B de HCV. Différents composés antiviraux agissant sur l'activité de réplication du virus ont été mis au point, et sont également en cours de test. Ils sont classés en deux catégories : les inhibiteurs nucléosidiques (NIs) qui bloquent l'activité du complexe de réplication de HCV, en se fixant au niveau du site actif de l'enzyme ; et les inhibiteurs non nucléosidiques (NNIs), qui se fixent à distance du site actif. L'étude de certains de ces composés a été arrêtée suite à la présence d'effets secondaires et d'une faible efficacité antivirale. C'est le cas, pour les NIs, de la Valbicitabine et du composé R1626. A l'heure actuelle, les composés RG7128 et PSI-7977 sont les plus avancés (ils ont atteint la phase 2 des tests cliniques). Au niveau des NNIs certaines molécules sont également parvenues en phase 2, comme la Filibuvir ou encore le Tegobuvir (pour revue (Vermehren & Sarrazin, 2010)) (Tableau 1).

Drug name	Company	Target/active drug	Study phase
NS3/4A protease inhibitors			
Ciluprevir (BILN 2061)	Boehringer Ingelheim	Active site/macrocyclic	Stopped
Boceprevir (SCH503034)	Merck	Active site/linear	Phase 3
Telaprevir (VX-950)	Vertex	Active site/linear	Phase 3
Danoprevir (RG 7227)	InterMune/Roche	Active site/macrocyclic	Phase 2
TMC435	Tibotec/Medivir	Active site/macrocyclic	Phase 2
Vaniprevir (MK-7009)	Merck	Active site/macrocyclic	Phase 2
BI 201335	Boehringer Ingelheim	Active site/linear	Phase 2
BMS-650032	Bristol-Myers Squibb	Active site	Phase 2
GS-9256	Gilead	Active site	Phase 2
ABT-450	Abbott/Enanta	Active site	Phase 2
Narlaprevir (SCH900518)	Merck	Active site/linear	O n hold
PHX 1766	Phenomix	Active site	Phase 1
ACH-1625	Achillion	Active site	Phase 1
IDX 320	Idenix	Active site/macrocyclic	O n hold
MK-5172	Merck	Active site/macrocyclic	Phase 1
VX-985	Vertex	Active site	Phase 1
GS-9451	Gilead	Active site	Phase 1
Nucleos(t)ide NS5B polymerase inhibitors			
Valopicitabine (NM283)	Idenix/Novartis	Active site/NM107	Stopped
RG 7128	Roche/Pharmasset	Active site/PSI-6130	Phase 2
IDX 184	Idenix	Active site	O n hold
R1626	Roche	Active site/R1479	Stopped
PSI-7977	Pharmasset	Active site	Phase 2
Non-nucleoside NS5B polymerase inhibitors			
BILB 1941	Boehringer Ingelheim	NNI site 1/thumb 1	Stopped
BI 207127	Boehringer Ingelheim	NNI site 1/thumb 1	Phase 2
MK-3281	Merck	NNI site 1/thumb 1	Stopped
Filibuvir (PF-00868554)	Pfizer	NNI site 2/thumb 2	Phase 2
VX-916	Vertex	NNI site 2/thumb 2	O n hold
VX-222	Vertex	NNI site 2/thumb 2	Phase 2
VX-759	Vertex	NNI site 2/thumb 2	Phase 1
ANA598	Anadys	NNI site 3/palm 1	Phase 2
ABT-333	Abbott	NNI site 3/palm 1	Phase 2
ABT-072	Abbott	NNI site 3/palm 1	Phase 2
Nesbuvir (HCV-796)	ViroPharma/W yeth	NNI site 4/palm 2	Stopped
Tegobuvir (GS-9190)	Gilead	NNI site 4/palm 2	Phase 2
IDX 375	Idenix	NNI site 4/palm 2	Phase 1
NS5A inhibitors			
BMS-790052	Bristol-Myers Squibb	NS5A domain 1 inhibitor	Phase 2
BMS-824393	Bristol-Myers Squibb	NS5A inhibitor	Phase 1
PPI-461	Presidio	NS5A inhibitor	Phase 1
AZD7295	AstraZeneca	NS5A inhibitor	Phase 1
Indirect inhibitors/unknown mechanism of action			
NIM811	Novartis	Cyclophilin inhibitor	Stopped
SCY-635	Scynexis	Cyclophilin inhibitor	Phase 1
Alisporivir (Debio 025)	Debiopharm/N ovartis	Cyclophilin inhibitor	Phase 2
Nitazoxanide	Romark	PKR induction?	Phase 2
Celgosivir	Migenix	a-Glucosidase inhibitor	Phase 2
New interferons			
Locteron (BLX-883)	Biolex	Interferon receptor type 1	Phase 2
PEG-rIL-29 (pegylated interferon)	ZymoGenetics/BMS	Interferon receptor type 3	Phase 2
Joulferon (albinterferona-2b)	HGS/Novartis	Interferon receptor type 1	Stopped

(d'après (Vermehren & Sarrazin, 2010))

Tableau 1 : Nouvelles molécules STAT-C en cours d'étude clinique.

Présentation des différentes molécules anti-HCV en cours d'essai clinique, ainsi que leurs principales caractéristiques.

La protéine NS5A a également été choisie comme cible thérapeutique, du fait de son rôle important dans la réplication, mais aussi dans l'assemblage du HCV. Ainsi on peut citer le composé BMS-790052, qui inhibe l'action de cette protéine virale et induit une relocalisation de cette protéine au niveau sub-cellulaire (Lee et al, 2011). Concernant cette molécule, les premiers résultats de phase 2 sont assez prometteurs (Tableau 1).

Cependant il a été montré que des mutants résistants aux composés STAT-C sont produits au cours de l'infection. Ainsi est-il important d'utiliser ces nouvelles molécules en

combinaison, avec par exemple le traitement existant, afin de limiter l'apparition de mutations de résistance.

Pour surmonter l'obstacle que constitue l'apparition de mutants résistants aux molécules STAT-C, une autre approche intéressante consiste en l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans le cycle viral de HCV. Un premier point à prendre en compte avec cette approche est l'éventuelle toxicité que peut engendrer l'inhibition du facteur cellulaire ciblé (Khattab, 2009). Ainsi il a été montré que la cyclophiline joue un rôle important au niveau de l'étape de réplication de HCV (Kaul et al, 2009). L'inhibiteur spécifique de ce facteur, le Debio-025, est actuellement en phase 2 des tests cliniques (Flisiak et al, 2009) et ne présente pas d'activité immunosuppressive ; l'approche est pour le moment assez prometteuse, et les derniers résultats obtenus sur un patient infecté par le génotype 3 sont encourageants (Patel & Heathcote, 2011). Un autre composé également intéressant est la silybinine. C'est un des six flavonoïdes majeur issu de la silymarine, que l'on extrait du chardon Marie, et qui possède une activité anti-oxydante ; cette molécule est utilisée depuis longtemps en automédication pour traiter les maladies du foie (Gazak et al, 2007). Les mécanismes par lesquels elle agit sur le HCV ne sont pas encore complètement élucidés, cependant elle est capable d'inhiber la réplication du virus (Ahmed-Belkacem et al, 2010), mais également de bloquer son entrée dans les cellules cibles (Wagoner et al, 2010). Les études sur de larges cohortes de patients sont actuellement en cours.

C. Perspectives de vaccination

De nos jours, plusieurs stratégies vaccinales sont en cours d'élaboration ou de test. L'approche thérapeutique et l'approche prophylactique sont toutes deux envisagées, et, en l'état actuel des connaissances sur HCV, ont permis d'élaborer plusieurs stratégies dont certaines semblent assez prometteuses (pour revue (Torresi et al, 2011)) (Tableau 2).

Une prévention efficace de l'infection par HCV doit présenter différentes caractéristiques. Tout d'abord le candidat vaccin doit être capable de stimuler une forte réponse immunitaire multi spécifique des T CD4+ et des T CD8+. De plus l'induction d'anticorps neutralisants, dirigés notamment contre les protéines d'enveloppe E1 et E2, capables de fournir une protection contre différentes souches du virus est également une nécessité. Une des difficultés supplémentaires est l'existence de nombreuses quasi-espèces de HCV au sein d'un individu infecté, pouvant amener à la sélection de mutants d'échappement. Cela implique la sélection d'épitopes dans des régions conservées entre les différentes souches du virus. Peu de stratégies vaccinales remplissent ces différentes conditions. Des

études sur les chimpanzés ont donné des résultats encourageants pour ce genre d'approche, notamment par l'injection de protéines E1 et E2 recombinantes (Choo et al, 1994; Houghton, 2000). Certaines protéines recombinantes sont d'ailleurs en phase 1 des tests cliniques. Une autre approche prometteuse est l'élaboration de HCV-VLP qui permet de remplir toute les conditions nécessaires à une bonne protection (Barth et al, 2005; Baumert et al, 1999; Elmowalid et al, 2007), comme décrit précédemment. Cette approche a déjà pu être concrétisée sur d'autres virus, mais n'en est qu'au stade d'étude préclinique pour HCV (Tableau 2).

L'élaboration de vaccins thérapeutiques est une stratégie qui cette fois ne vise pas à protéger un individu contre une éventuelle infection, mais à renforcer l'action du système immunitaire des personnes ayant contracté la maladie. Les données provenant de différentes études suggèrent que l'efficacité de la bithérapie IFN/Ribavirine est intimement liée à la réponse immunitaire de l'hôte (Baumert et al, 2000; Cramp et al, 2000). En renforçant celle-ci par un vaccin approprié, il serait possible d'augmenter l'efficacité des thérapies existantes. Différentes approches sont tentées dans ce domaine, comme la mise au point de peptides recombinants, de vaccin à base d'ADN ou encore de virosomes. Certaines de ces approches arrivent en phase 2 des tests cliniques, comme le IC41 qui est un vaccin contenant 5 peptides synthétiques pour stimuler la réponse immunitaire anti-HCV (Wedemeyer et al, 2009) (Tableau 2). Un autre exemple que l'on peut citer est celui du GI-5005. L'approche consiste ici en l'injection d'une souche inactivée de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante exprimant les protéines de capsid et NS3 de HCV (Habersetzer et al, 2009). Les résultats sont également prometteurs dans ce dernier cas de figure (Tableau 2).

Prophylactic vaccine	Immunogenicity	Challenge inoculum	Outcome	Phase I - IV
Chiron Corp HCV E1/E2 Vaccine		Recombinant E1 and E2 proteins	Trial completed data not yet published	Phase I randomized, observer-blinded, placebo-controlled study
Therapeutic vaccines	Immunogenicity	Challenge inoculum	Outcome	Phase I - IV
Pevion Biotech Ltd		Virosome-formulated peptides (CD4 and CD8 components)	Ongoing- not recruiting, data not published	Phase I
Intercell AG	Induce HCV-specific T cell responses Weak reduction in viral load	IC41 HCV peptide vaccine with polyarginine	Completed	Phase II
Intercell AG	HCV-specific T cell responses only one patient experiencing a one- \log_{10} reduction in viral load	IC41 HCV peptide vaccine with polyarginine	Trial ongoing not recruiting	Phase II
Innogenetics / GenImmune	Induce both humoral and cellular immune responses against HCV E1	135aa C-terminally truncated recombinant form of E1 protein, formulated on alum	2 placebo controlled trials completed; program stopped as no effect on fibrosis progression was detected	Phase IIb
GlobelImmune	Reduction in ALT compared with placebo and reduction in viral load to -1.4 log	GI-5005; an inactivated recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing a hepatitis C virus NS3-Core fusion protein	ongoing	Phase I
GlobelImmune	ETR 74% vs 59% for standard of care therapy. SVR 58% vs 48% for standard of care therapy	GI-5005 combined with pegylated Interferon plus Ribavirin	ongoing	Phase II
Tripep	Safe, immunogenic and transient effects on viral load	DNA based vaccine CHRONVAC-C [®] in combination with electroporation	Recruiting patients	Phase I/IIa
Transgene	T cell responses (detected by ELISpot IFN- γ) and viral load reduction up to 1.5 log observed	TG4040 MVA virus carrying and expressing non-structural proteins (NS3, NS4 and NS5B)	Recruiting patients	Phase I

(D'après (Torresi et al, 2011))

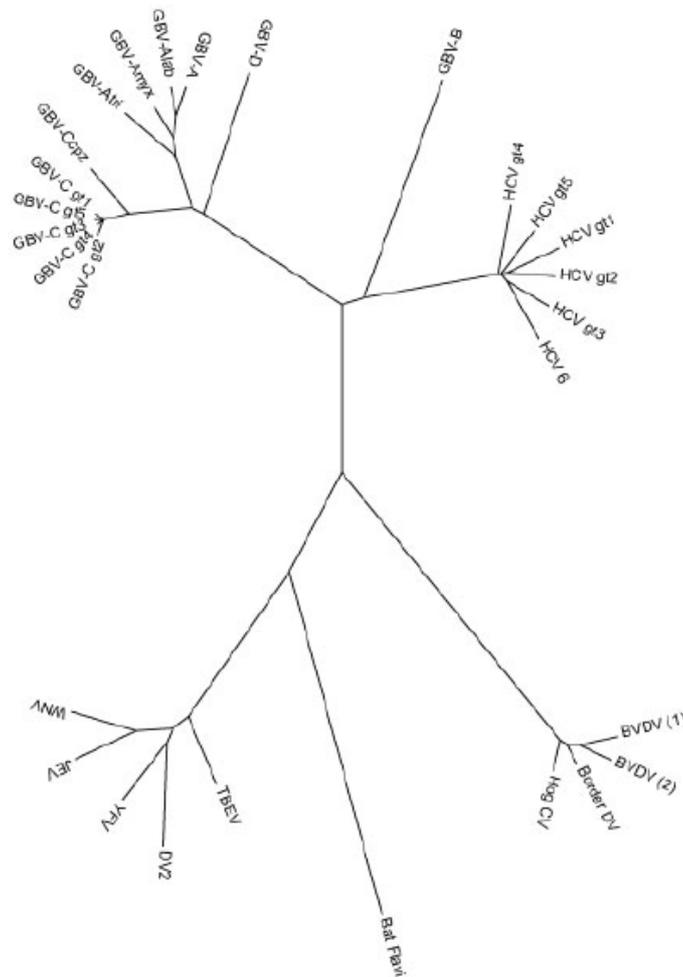
Tableau 2 : Différents vaccins anti-HCV en cours d'études clinique.

Présentation des différents vaccins anti-HCV, prophylactiques ou thérapeutiques, en cours d'essais clinique, ainsi que leurs principales caractéristiques.

B. Le virus de l'hépatite C

I. Classification et variabilité génomique

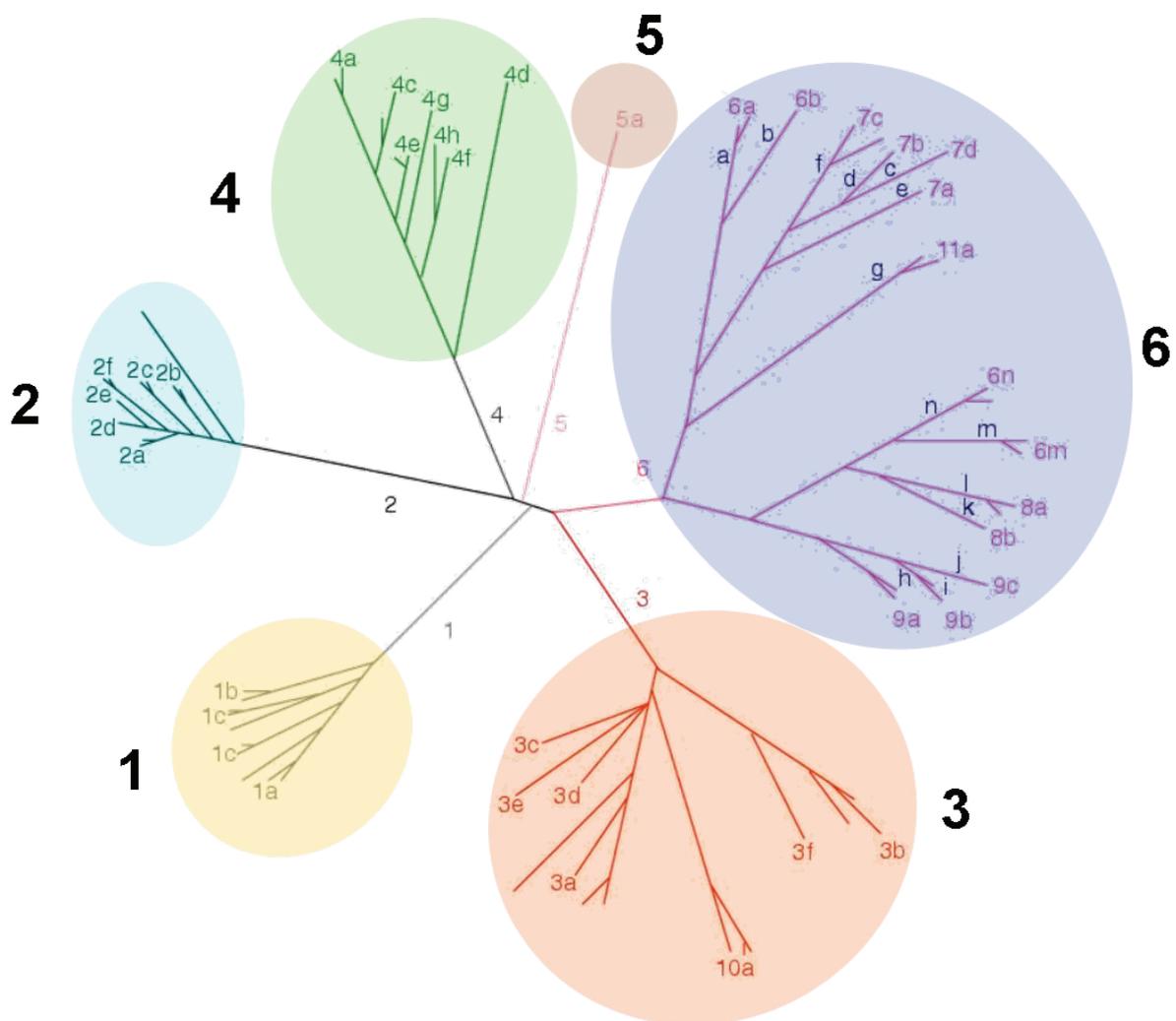
L'analyse phylogénétique du génome du virus de l'hépatite C a permis de le classer dans la famille des *Flaviviridae* (Choo et al, 1991). Cette famille comprenait initialement deux genres : les *Flavivirus* (incluant la Dengue, le virus de la fièvre jaune, ou encore le virus du Nil occidental) et les *Pestivirus* (incluant le virus de la peste porcine classique ou le virus de la diarrhée bovine). Néanmoins, le HCV se distingue des autres membres de cette famille par l'organisation génomique de ses protéines. Ce constat a eu pour conséquence la classification de ce virus dans un nouveau genre : les *Hepacivirus* (Robertson et al, 1998). Par la suite le virus GBV-B a été inclu dans ce genre, car présentant une forte identité de séquence avec HCV. Il est à noter que les deux autres virus GBV (le A et le C), ont été récemment classés dans le genre *Pegivirus* (Stapleton et al, 2010) (Figure 7).



(D'après (Stapleton et al, 2010))

Figure 7 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae.

Le virus de l'hépatite C possède une très grande variabilité génétique. Cette variabilité est due à l'accumulation de mutations dans le génome au moment de la réplication virale. En effet, comme beaucoup d'autres virus à ARN positif, le HCV utilise une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) pour sa réplication. Ces polymérases ont un taux d'erreur important et ne possèdent pas d'activité de correction. Ainsi, le taux d'erreur de la polymérase de HCV, de 10^{-4} à 10^{-5} par position nucléotidique (Pawlotsky, 2003), et l'importance de la production virale d'environ 10^{12} virions par jour (Neumann et al, 1998), permettent d'accumuler les erreurs de réplication, générant ainsi une grande diversité génétique au sein des individus infectés, et l'apparition de nombreuses quasi-espèces.



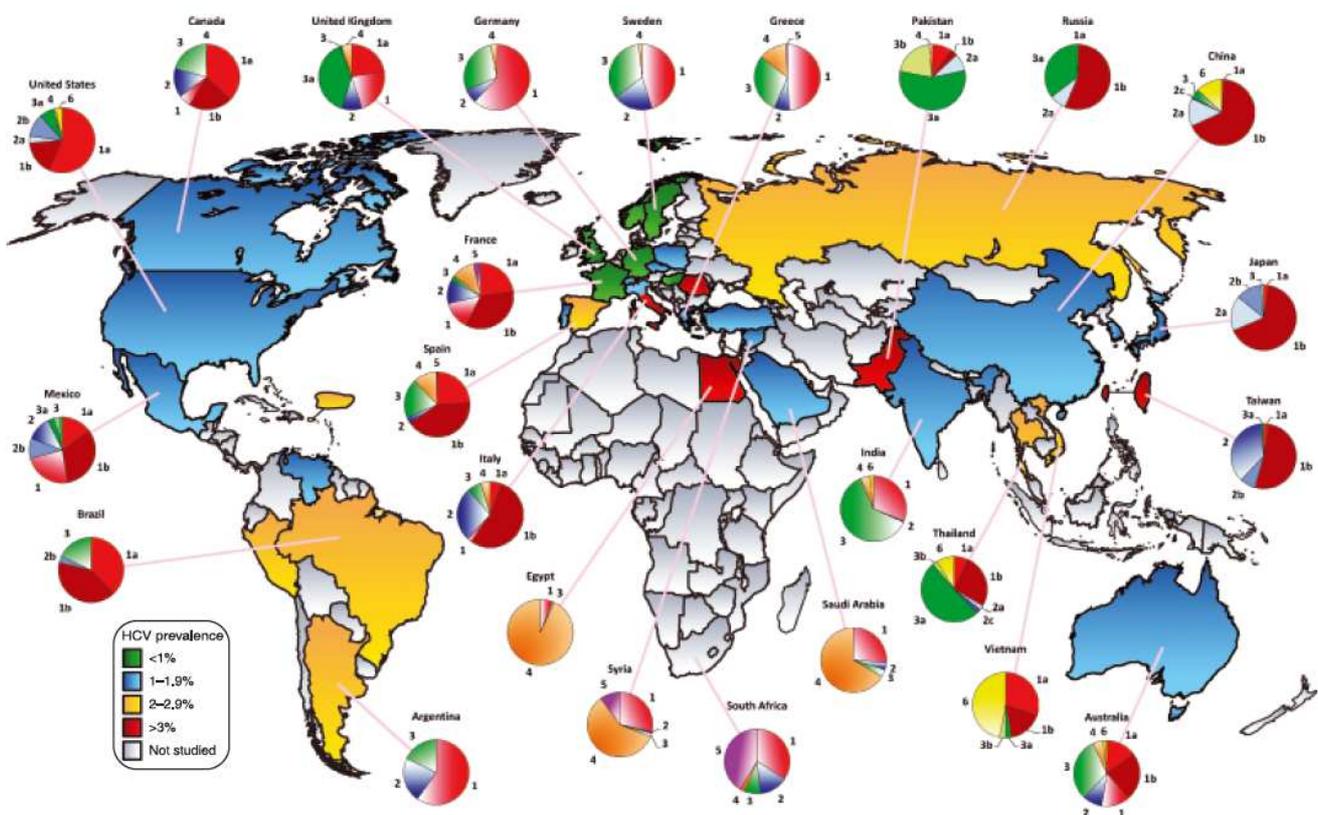
(Adapté d'après (Gaudy & Goudeau, 2005))

Figure 8 : Arbre phylogénétique du virus de l'Hépatite C.

Les différentes souches de HCV ont été classées en six génotypes principaux, grâce à l'analyse phylogénétique (Simmonds et al, 1993). Ces génotypes sont numérotés de 1 à 6. Au sein du même génotype les différentes souches présentent plus de 70% d'identité sur leur

génomme complet. Un même génotype regroupe de nombreux sous-types ; au sein d'un de ces groupes les individus ne diffèrent que de 20 à 25%. Une lettre minuscule est attribuée à chaque sous-type (Kuiken & Simmonds, 2009; Simmonds et al, 2005). Enfin, au-delà de 90% d'homologie de séquence, il est question de quasi-espèce virale. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les évènements de recombinaison inter-génotypique ont été décrits pour HCV (Kalinina et al, 2002) (Figure 8).

Les différents génotypes de HCV sont répartis d'une manière inégale à la surface du globe. Certains génotypes sont détectés partout dans le monde, avec toutefois une prévalence variant selon les régions (Figure 9). Ainsi les génotypes 1, 2 et 3 sont présents sur chaque continent, alors que la répartition des génotypes 4, 5 et 6 est restreinte à certaines régions du globe (Dusheiko et al, 1994; McOmish et al, 1994). Le génotype 4 est en effet retrouvé principalement au Moyen-Orient, et en Afrique du Nord et Sub-saharienne (Morice et al, 2001), le génotype 5 en Afrique du Sud, et le génotype 6 dans les pays d'Asie du Sud-Est (Davidson et al, 1995; Mellor et al, 1995). En France 57% des infections par HCV sont dues à une souche de génotype 1 (41% pour le 1b, et 16% pour le 1a), 22% à cause d'une souche de génotype 3 et 11% à une souche de génotype 2 (Martinot-Peignoux et al, 1999).



(D'après (Negro & Alberti, 2011))

Figure 9 : Répartition mondiale des différents génotypes de HCV

Il est intéressant de noter que les génotypes diffèrent également du point de vue clinique. Tout d'abord ils ne réagissent pas de la même manière face au traitement IFN α /ribavirine. Ce traitement se révèle en effet plus efficace sur les infections causées par les génotypes 2 et 3, alors que les infections par les génotypes 1 et 4 répondent beaucoup moins bien (Feld and Hoofnagle, 2005; Zein, 2000). Enfin les patients atteints par une infection due au génotype 3 possèdent un plus grand risque de développer une stéatose hépatique (Adinolfi et al, 2001; Hourieux et al, 2007).

II. Propriétés biophysiques de la particule

HCV est un virus enveloppé de forme sphérique dont le diamètre est estimé entre 55 et 65 nm (Kaito et al, 1994). La particule virale est constituée d'une nucléocapside, d'un diamètre de 33 à 40 nm, et issue de l'assemblage de la protéine de capsid (Ishida et al, 2001). Elle renferme le génome viral sous la forme d'un simple brin d'ARN de polarité positive. Cette nucléocapside est enveloppée par une membrane lipidique issue de la cellule hôte et dans laquelle les protéines d'enveloppe E1 et E2, hautement glycosylées, viennent s'ancrer (Kaito et al, 2006) (Figure 10).

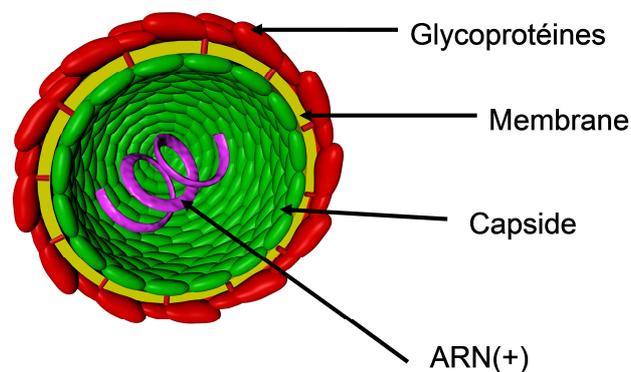


Figure 10 : Représentation schématique d'une particule de HCV

Cependant les virions de HCV isolés de sera de patients possèdent des densités et des formes relativement hétérogènes. Il a été établi que la densité des particules virales varie entre 1.03 et 1.25 g/ml, parfois plus, et que celle-ci varie également d'un sérum à l'autre (Pumeechockchai et al., 2002; Thomssen et al., 1993).

Les particules possédant les plus faibles densités (de 1.03 à 1.08 g/ml) résultent d'une association avec des lipoprotéines de faible ou très faible densité (LDL ou VLDL), en particulier grâce à l'interaction avec des macromolécules comme les apolipoprotéines B et E (Andre et al., 2002; Hijikata et al., 1993). Cette association montre tout d'abord que la production virale est dépendante du mécanisme d'assemblage et de sécrétion des VLDL

(Huang et al, 2007a). Ensuite elle peut présenter plusieurs intérêts pour les virions, comme d'une part l'échappement au système immunitaire, en offrant une certaine protection vis-à-vis des anticorps neutralisants, et d'autre part au niveau mécanistique : en effet le récepteur LDL est décrit comme un facteur d'attachement de HCV. Les particules de haute densité (de 1.17 à 1.25 g/ml) sont quant à elles associées à des immunoglobulines, et sont peu infectieuses (Choo et al, 1995; Hijikata et al, 1993b).

Enfin, les particules virales les plus infectieuses semblent être celles possédant une densité comprise entre 1.09 et 1.11 g/ml (Bradley et al, 1991; Hijikata et al, 1993b). Il a été montré que les particules virales sont assemblées dans un compartiment cellulaire avec une forte densité ($> 1.15\text{g/ml}$), mais que durant leur sécrétion elles acquièrent des éléments leur conférant une densité plus faible ($< 1.14\text{g/ml}$) (Gastaminza et al, 2006). Par ailleurs une étude récente suggère que les particules de faible densité présentent une fusogénicité supérieure (Haid et al, 2009).

III. Organisation du génome

Le génome viral de HCV est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 kb (Choo et al, 1989). Les deux extrémités du génome sont non codantes, elles sont désignées comme 5'UTR et 3'UTR, et bordent un seul cadre ouvert de lecture (ORF). Ce cadre unique code une seule polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Reed & Rice, 2000) (Figure 11).

Cadre Ouvert de Lecture

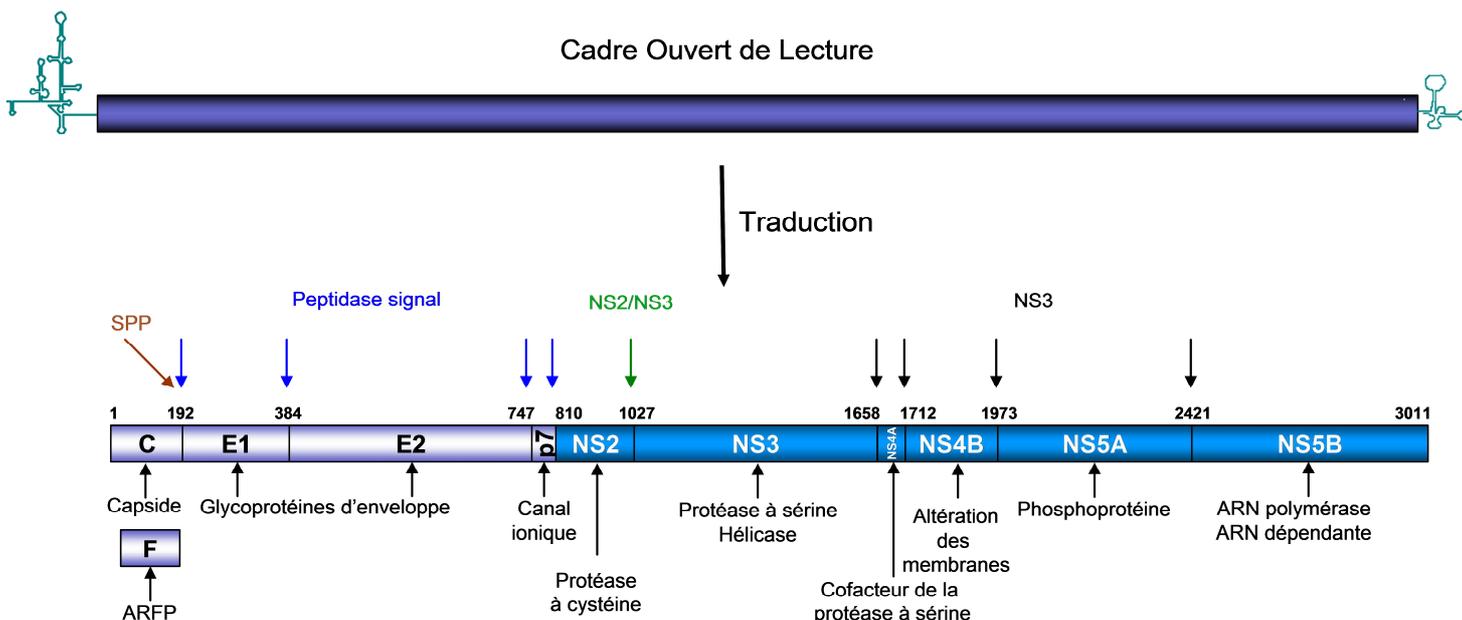


Figure 11 : Organisation génomique du Virus de l'Hépatite C.

Le génome viral de HCV comporte un seul cadre ouvert de lecture (en violet), flanqué en 5' et 3' de deux régions non traduites (UTR) (en bleu-vert). Ce cadre ouvert sera traduit en un seul précurseur protéique qui sera clivé par la peptidase de signal peptide (SPP) (flèche marron), des signal-peptidases cellulaires (flèches bleues), les protéases virales (NS2/3 (flèche verte) et le complexe NS3/4A (flèches noires)). Les différentes protéines virales seront ainsi libérées (les protéines structurales en bleu clair et les protéines non-structurales en cyan). La position des sites de clivage ici indiqués correspondent à ceux de la souche H (génotype 1a ; numéro d'accèsion AF009606).

A. Les extrémités non codantes

1. La région 5'UTR

La région 5'UTR joue un rôle essentiel dans la traduction du génome viral et dans la réplication. Cette région est très conservée, même s'il a été décrit que trois zones nucléotidiques variaient en fonction des génotypes (Bukh et al, 1992). Cette région est fortement structurée, sous la forme de tiges boucles et de pseudo-nœuds, permettant d'identifier 4 domaines distincts (nommés I à IV). Les domaines I et II (nucléotides 1 à 115) comportent des signaux critiques pour la réplication, toutefois la région complète 5'UTR est nécessaire pour une réplication complète du génome viral (Friebe et al, 2001; Kim et al, 2002). Les domaines II, III et IV (nucléotide 44 à 341) ainsi que le début de la séquence codante constituent l'IRES ou site interne d'entrée du ribosome. Cette région est indispensable à l'initiation de la traduction de la protéine virale. Elle permet en effet à l'ARN viral de se lier à la sous-unité 40S du ribosome de manière analogue aux ARNm procaryotes (Honda et al, 1996; Pestova et al, 1998) et ce grâce à la partie basale du domaine III de la région 5'UTR. Par la suite, une fois le complexe 48S formé, le domaine II joue alors un rôle dans l'assemblage du ribosome sous sa forme 80S.

La région 5'UTR est une bonne cible pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. De fait elle possède une très bonne conservation de séquence entre les différents génotypes du HCV, son rôle est par ailleurs important dans l'initiation de la traduction du génome viral. Des études d'inhibitions de cette région, via l'utilisation d'ARN interférents ont été publiées récemment (Chevalier et al, 2007; Kanda et al, 2007).

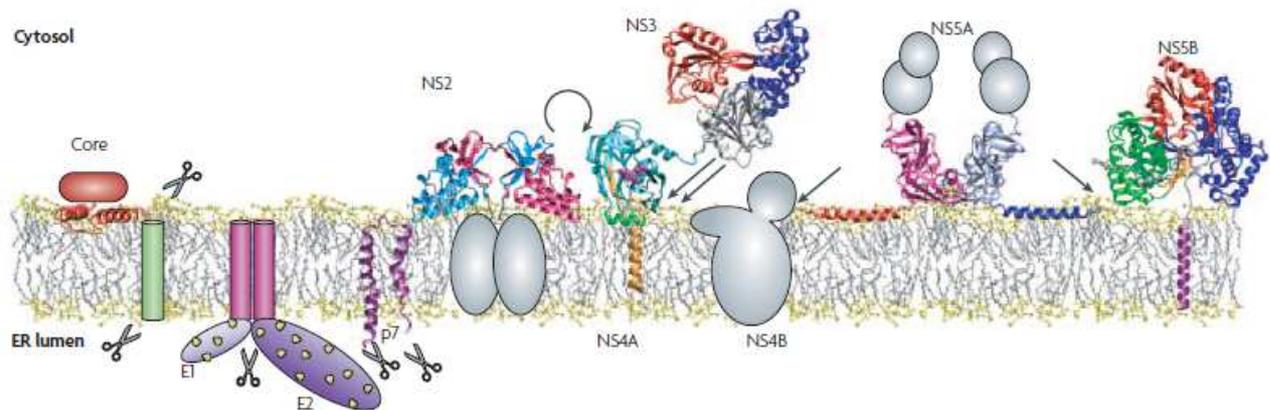
2. La région 3'UTR

La région 3'UTR est de taille variable, en fonction du génotype HCV et elle se divise en trois régions distinctes. Tout d'abord une zone peu conservée de 40 à 50 nucléotides. Ensuite une zone comportant un motif poly-uracile/pyrimidine (poly U/C), d'une longueur variable. Enfin une séquence très conservée de 98 nucléotides appelée X-tail (Kolykhalov et al, 1996).

Cette dernière zone comporte une structure secondaire formée de trois tiges boucles (Tanaka et al, 1996). Les éléments conservés de ce X-tail sont nécessaires pour la réplication et la traduction du génome viral (Kolykhalov et al, 2000; Yi & Lemon, 2003). En effet, cette séquence agirait sur l'activité de l'IRES HCV (Song et al, 2006).

B. Les protéines virales

La phase ouverte du génome viral code environ 3000 aa. Au cours de la traduction, dix protéines virales de HCV sont produites grâce à des clivages co et post-traductionnels pour donner 3 protéines structurales (C, E1, E2) et 7 protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Les clivages C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 sont assurés par des peptidases signal cellulaires (Dubuisson et al, 2002). Le reste de la polyprotéine est clivée par les protéases virales NS2 et NS3/4A (Figure 12). De plus il a été décrit que le décalage du cadre de lecture au début de la séquence de capsid conduisait à la formation d'une onzième protéine, dont le rôle est à ce jour inconnu : la protéine F ou ARFP (Lo et al, 1995; Lo et al, 1994).



(D'après (Moradpour et al, 2007))

Figure 12 : Les protéines de HCV et leur association avec la membrane du RE.

Les ciseaux indiquent les clivages par les peptidases signal (côté luminal) et peptidase de peptide signal (côté cytosolique) du RE. La flèche cyclique représente l'autoclivage par la protéine NS2/3, alors que les flèches directes représentent les différents clivages effectués par le complexe NS3/4A. Les formes pleines représentent les structures ou topologie encore mal connues de certains segments protéiques.

1. La protéine de Capside

La protéine de capsid, ou protéine C, constitue l'élément protéique de la nucléocapsid du HCV. Sa séquence est riche en aa proline et en aa basiques, arginine et lysine. Elle reste un élément relativement bien conservé entre les différents génotypes du virus. La protéine de capsid contient un peptide signal à son extrémité C-terminale qui est reconnu par un signal peptidase. Après clivage, une forme immature de la capsid, d'un poids moléculaire apparent de 23 kDa et comprenant 191 aa, est produite (Santolini et al, 1994). Puis un second clivage, médié par une peptidase de peptide signal, génère la forme mature de la protéine de capsid d'un poids moléculaire apparent de 21 kDa (de 173 à 179 aa) (McLauchlan, 2000).

La protéine de capsid se subdivise en trois domaines (Hope & McLauchlan, 2000). Le domaine I (aa 1 à 118), responsable de la liaison de la protéine de capsid à l'ARN génomique de HCV avec la région 5'UTR (Kunkel et al, 2001). Ce domaine hydrophile et contient des aa basiques nécessaires à la formation de la nucléocapsid (Klein et al, 2005). Il interagit également avec la tubuline dont l'interaction favorise la formation des microtubules *in vitro* (Roohvand et al, 2009). Le domaine II (aa 119 à 174), hydrophobe, est constitué de deux hélices α séparées par une courte boucle hydrophile. Ce domaine assure la maturation et la mise en conformation du premier domaine (Boulant et al, 2005). Il confère également les propriétés membranaires de la protéine. Celle-ci est majoritairement retrouvée au niveau des membranes associées aux gouttelettes lipidiques (GLs) (Rouille et al, 2006). Cette localisation est essentielle à la production virale (Miyanari et al, 2007). Enfin le domaine III (aa 175 à

191), très hydrophobe, permet l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE et sert, en tant que peptide signal, au transfert, dans la lumière du RE, de la glycoprotéine E1 (Santolini et al, 1994).

Une étude récente a démontré l'importance, pour la formation de particules virales infectieuses, de certains résidus basiques de la partie N-terminale de la protéine de capsid et cela dans une étape post-assemblage de la nucléocapsid (Alsaleh et al, 2010).

Il a également été rapporté que la protéine de capsid jouerait un rôle régulateur sur l'expression de certains gènes cellulaires au niveau de l'apoptose, de la prolifération cellulaire et de la réponse immunitaire (Jackel-Cram et al, 2007; Nguyen et al, 2006). Par sa localisation au niveau des GLs, la protéine de capsid agirait sur le métabolisme des lipides et contribuerait au développement d'une stéatose hépatique.

2. La protéine F

Le décalage de lecture du ribosome en -2/+1 au niveau d'une séquence de glissement, localisée entre les codons 8 et 11 de la séquence codant la protéine de capsid est responsable de l'expression de la protéine F ou ARFP (alternative ribosomal frameshift protein) (Branch et al, 2005; Lo et al, 1995; Lo et al, 1994; Walewski et al, 2001; Xu et al, 2001). Cependant, des sites d'initiations alternatifs de traduction de cette protéine ont été rapportés (Vassilaki & Mavromara, 2003), tout comme la possibilité d'un double décalage de lecture pour la protéine de génotype 1b (Boulant et al, 2003).

La taille de la protéine F est variable en fonction du génotype étudié et du site d'initiation impliqué mais elle ne dépasse jamais les 160 aa (Boulant et al, 2003). Sa demi-vie est estimée à dix minutes à cause d'une dégradation rapide par le protéasome (Roussel et al, 2003). La détection d'anticorps dirigés contre cette protéine, ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire chez des patients chroniquement infectés par HCV, suggèrent que cette protéine est exprimée durant l'histoire naturelle de l'hépatite C (Xu et al, 2001). Néanmoins, la fonction précise de cette protéine reste à ce jour non-élucidée. Il a été rapporté qu'elle ne serait pas nécessaire à la réplication du génome viral (McMullan et al, 2007; Vassilaki et al, 2008), mais qu'elle pourrait avoir des fonctions immunomodulatrices (Fiorucci et al, 2007).

3. Les protéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe jouent un rôle majeur dans les phénomènes d'attachement et d'entrée de HCV dans les cellules cibles (pour revue (Cocquerel et al,

2006)). Elles participent également à la formation des particules virales infectieuses (Wakita et al, 2005). Le génome du HCV code deux glycoprotéines d'enveloppe : E1 (aa 192 à 383) et E2 (aa 384 à 746). Les clivages au niveau des sites C/E1, E1/E2, E2/p7/NS2 libèrent la protéine E1 et un précurseur E2-p7-NS2. Celui-ci sera rapidement clivé à son tour pour donner la protéine E2, ainsi qu'une forme E2-p7 et la protéase NS2 (Dubuisson et al, 1994; Dubuisson et al, 2002).

a) Organisation des protéines E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 sont des protéines membranaires de type I, organisées en un large ectodomaine à l'extrémité N-terminale et un domaine transmembranaire (TMD) situé à l'extrémité C-terminale, comportant un seul passage transmembranaire. La partie N-terminale de ces protéines est orientée vers la lumière du RE et les TMDs sont insérés dans la membrane de ce compartiment cellulaire. Les TMDs contiennent non seulement des signaux d'hétérodimérisation, mais également d'adressage et de rétention dans le RE (Cocquerel et al, 1999; Cocquerel et al, 1998; Cocquerel et al, 2000; Flint & McKeating, 1999). Toutefois, le signal responsable de la translocation de l'ectodomaine de E1 dans la lumière du RE est, lui, localisé dans la partie C-terminale de la protéine de capsid (Santolini et al, 1994). Une étude rapporte que la mutation de certains aa au sein des TMDs des glycoprotéines modifie les propriétés de fusion de ces protéines. Cela suggère un rôle important de ces domaines dans le processus de fusion (Ciczora et al, 2007).

La partie N-terminale de E2 comporte une région hypervariable : HVR 1 (aa 384 à 410). Cette région est un déterminant majeur des propriétés antigéniques de la protéine E2 et sa forte variabilité donnerait au HCV la capacité d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Malgré cette variabilité, les propriétés biochimiques des aa constituant cette séquence sont relativement bien conservées parmi les différents géotypes du HCV (Penin et al, 2001). De plus cette région est notamment composée de plusieurs aa basiques qui sont capables de moduler l'infectiosité des particules virales de HCV (Callens et al, 2005). Il est à noter que deux autres régions hypervariables ont été identifiées au sein de E2 et peuvent jouer un rôle au niveau de l'entrée virale : il s'agit de HVR 2 (aa 474 à 482) et HVR 3 (aa 431 à 466) (Roccasecca et al, 2003; Troesch et al, 2006; Weiner et al, 1991).

A l'heure actuelle aucune donnée ne permet de définir précisément quelle protéine de HCV joue le rôle de protéine de fusion. Les similitudes de séquence entre la région couvrant les aa 264 à 290 de E1 et les peptides de fusion connus pour les *Flavivirus* et les *Paramyxovirus* font de cette protéine un candidat intéressant (Drummer et al, 2007; Flint et al,

1999). Mais la protéine E2, qui possède une structure proche de la protéine E du virus de l'encéphalite à tiques, pourrait également correspondre à une protéine de fusion de classe II (Yagnik et al, 2000). Enfin, il n'est pas exclu que ces deux protéines soient toutes deux impliquées dans le processus de fusion. Par l'étude de la fusion entre des liposomes et des particules pseudotypées avec les protéines d'enveloppe de HCV, il a été démontré que trois régions sont importantes pour la fusion : la première située dans E1 (aa 272 à 287) et les deux autres dans E2 (aa 419 à 433 et 597 à 620) (Lavillette et al, 2007).

b) Biogenèse et maturation des protéines E1 et E2

Durant leur passage par le RE, les glycoprotéines E1 et E2 suivent deux voies d'assemblage. La première, dite productive, donne lieu à la formation d'hétérodimères E1-E2 non-covalents. La seconde, dite non-productive, amène quant à elle à la formation d'agrégats hétérogènes liés par des ponts disulfures (Deleersnyder et al, 1997; Dubuisson et al, 1994). L'association en hétérodimères non-covalents est considérée comme la forme fonctionnelle. La rétention de ces complexes au niveau du RE est dû aux TMDs (Cocquerel et al, 1999; Cocquerel et al, 1998) qui participent également à l'hétérodimérisation de ces glycoprotéines (Op De Beeck et al, 2000). Ces hétérodimères seraient la forme de pré-bourgeonnement des complexes E1E2 présents à la surface des particules virales. La mise en conformation des deux glycoprotéines dépend de leur association à des protéines chaperons du RE. Ainsi, la calnexine s'associe aux hétérodimères non-covalents, alors que la calréticuline et BiP interagissent préférentiellement avec les agrégats covalents (Choukhi et al, 1998; Dubuisson & Rice, 1996).

Les ectodomains de E1 et E2 sont quant à eux fortement N-glycosylés. La protéine E1 possède quatre sites de glycosylation conservés parmi tous les génotypes d'HCV (positions : 196, 209, 234 et 305), ainsi que d'autres sites potentiels qui eux ne sont conservés que pour certains génotypes (Figure 13). Il s'agit d'un site en position 250 pour les génotypes 1b et 6, et d'un autre en position 299 pour le génotype 2b (Goffard & Dubuisson, 2003; Zhang et al, 2004b). En ce qui concerne E2, il y a neuf sites de N-glycosylation conservés parmi la totalité des génotypes HCV (positions 417, 423, 430, 448, 532, 556, 576, 623, et 645) (Figure 13). De plus, un site supplémentaire en positions 476 est rarement présent dans le génotype 1b ; un autre site au niveau de la position 540 est lui absent dans les génotypes 3 et la plupart des génotypes 6. Malgré une forte variabilité de HCV, nous pouvons remarquer une très bonne conservation de la majorité de ces différents sites de glycosylation des

protéines d'enveloppe. Ceci suggère un rôle important des glycanes au niveau du cycle viral du HCV.

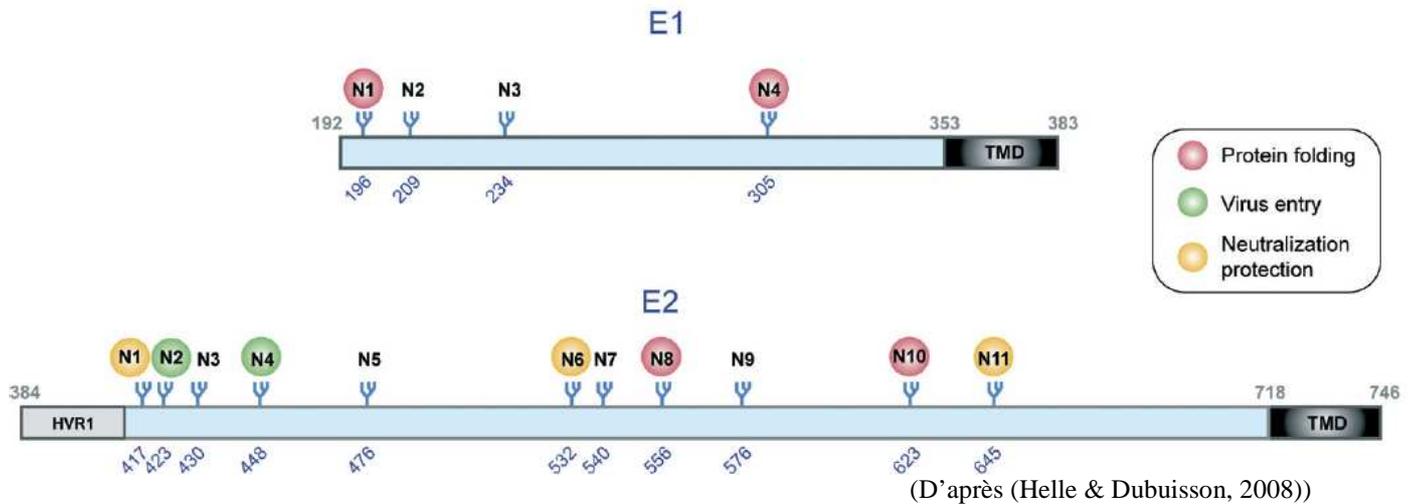


Figure 13 : Représentation schématique des glycoprotéines E1 et E2.

La position des sites de N-glycosylation des protéines d'enveloppe est indiquée par un N suivi du numéro du site de glycosylation sur la séquence protéique. En dessous est reportée la position de chaque site au sein de la polyprotéine virale, par rapport à la souche H (génotype 1a, numéro d'accèsion AF009606). Les sites de glycosylations impliqués dans le repliement de ces deux protéines sont indiqués en rose. L'entrée du virus dans les cellules est indiquée en vert. Enfin la protection du virus vis-à-vis d'anticorps neutralisants est signalé en orange. TMD, domaine transmembranaire ; HVR1, région hypervariable 1.

La N-glycosylation des protéines d'enveloppe intervient au niveau du RE. De plus, la présence de E2 est nécessaire à la glycosylation de E1 ce qui traduit un événement post-traductionnel et non co-traductionnel de la glycosylation (Dubuisson et al, 2000). Cependant, ce phénomène n'est apparemment pas dépendant d'une séquence spécifique de la protéine E2. Les glycanes associés aux protéines E1 et E2 sont importants pour le bon repliement et l'hétérodimérisation de ces protéines (Meunier et al, 1999; Slater-Handshy et al, 2004). De plus, ils jouent un rôle dans l'entrée du virus (Goffard et al, 2005) en modulant l'accessibilité aux facteurs d'attachement (Falkowska et al, 2007). Enfin, ils peuvent moduler également l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe avec les anticorps neutralisants potentiels et ainsi avoir un rôle protecteur contre ceux-ci (Helle et al, 2007).

4. La protéine p7

La protéine p7 est constituée de 63 aa (747 à 809). C'est une protéine hydrophobe qui se situe à la jonction entre les protéines structurales et non-structurales du HCV (Lin et al, 1994). Il a été observé une variabilité relative pour les séquences codant p7 parmi les différents génotypes de HCV, mais l'organisation générale de cette protéine, ainsi que la nature des aa la constituant reste constante (Carrere-Kremer et al, 2002). La protéine p7 est clivée en N- et C-terminale par une peptidase signal d'origine cellulaire. Toutefois, des

formes partiellement clivées E2/p7 et p7/NS2 sont souvent observées (Carrere-Kremer et al, 2004). Ces dernières ne semblent pas essentielles à une infection productive (Jones et al, 2007).

La protéine p7 est principalement localisée au niveau des membranes du RE, mais elle peut être également retrouvée dans les membranes mitochondriales (Carrere-Kremer et al, 2002; Griffin et al, 2005). Elle est constituée de deux passages transmembranaires (aa 19 à 32 et 36 à 58) séparés par un petit segment basique (aa 33 à 35). Les parties N- et C-terminales sont dirigées vers la lumière du RE.

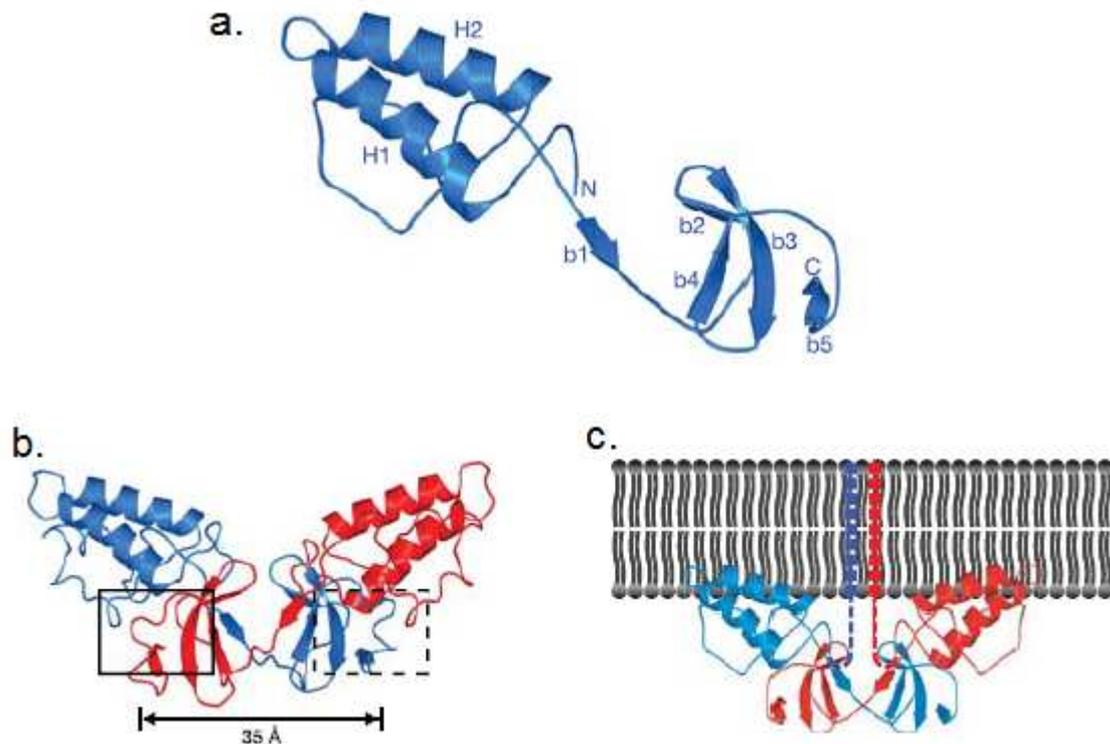
La fonction de cette protéine n'a pas encore été identifiée. *In vitro* p7 est capable de s'associer en multimères pour former des canaux ioniques (Griffin et al, 2004; Luik et al, 2009; Pavlovic et al, 2003), mais elle ne semble pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral. Cependant, les infections productives en système HCVcc (Jones et al, 2007) et *in vivo* chez le chimpanzé nécessitent cette protéine (Sakai et al, 2003). Des études récentes suggèrent que p7 joue un rôle dans la morphogénèse des particules virales (Jones et al, 2007) et qu'elle est essentielle à la sécrétion des particules infectieuses (Steinmann et al, 2007).

5. La protéine NS2

NS2 est une protéine transmembranaire (aa 810 à 1026) non-essentielle à la formation du complexe de réplication du HCV (Blight et al, 2000; Lohmann et al, 1999). Même si la topologie de NS2 n'est pas clairement définie, il a d'abord été suggéré que cette protéine serait organisée en quatre domaines transmembranaires (Yamaga & Ou, 2002). Néanmoins le domaine C-terminal semble être cytosolique, ce qui correspondrait plutôt à une topologie à un ou trois domaines transmembranaires (Lorenz et al, 2006) (Figure 14).

Le clivage entre p7 et NS2 est effectué par une peptidase signal cellulaire du RE (Carrere-Kremer et al, 2002; Carrere-Kremer et al, 2004) alors que le clivage entre NS2 et NS3 est réalisé de manière autoprotéasique. La protéine NS2 a été définie initialement comme la seconde protéase du VHC responsable du clivage entre NS2 et NS3 (Grakoui et al, 1993a). Récemment il a été démontré que seuls les 2 premiers aa de NS3 sont nécessaires au clivage entre NS2 et NS3 (Schregel et al, 2009). Cependant, les 180 premiers aa de NS3, décrits précédemment comme le minimum requis à cette activité protéasique (Lindenbach & Rice, 2005), augmentent grandement l'efficacité du clivage en agissant comme cofacteur. La structure du domaine catalytique de NS2 montre qu'il s'agit d'une protéase à cystéine dimérique comportant deux sites actifs (Lorenz et al, 2006). L'activité de cette protéase

nécessite une activation par Hsp90 (Waxman et al, 2001). Exprimée seule, NS2 est associée aux membranes du RE (Franck et al, 2005).



(Adapté d'après (Lorenz et al, 2006))

Figure 14 : Structure 3D de la protéine NS2.

(a.) Structure 3D du monomère de NS2 ; les extrémités N-terminale (N) et C-terminale (C), ainsi que les hélices (H) et feuillettes β (b) sont ici indiqués.

(b.) Structure 3D du dimère de NS2 ; les sites actifs de la protéase sont indiqués par deux carrés.

(c.) Représentation 3D du dimère de NS2 et de sa position par rapport à la membrane du RE.

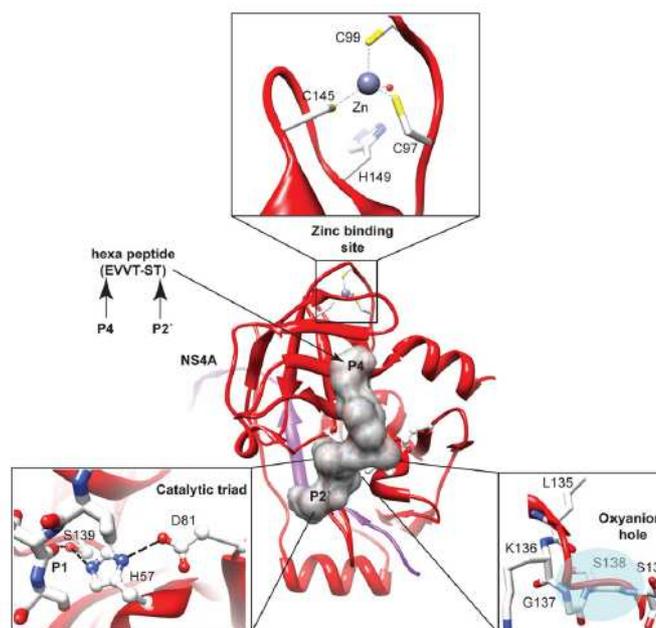
Bien que le rôle exact de NS2 ne soit pas connu, plusieurs fonctions peuvent lui être attribuées, en plus de son rôle protéolytique. Cette protéine serait impliquée dans la morphogénèse de la particule virale (Jones et al, 2007; Yi et al, 2007) et elle aurait un rôle crucial de médiateur entre les différentes protéines virales de HCV au moment de l'assemblage des particules (Popescu et al, 2011). Son implication dans la phosphorylation de NS5A a également été décrite (Liu et al, 1999).

Enfin il est à noter que des sites de recombinaisons pouvant conduire à la formation de virus chimériques intergénomiques infectieux y ont été cartographiés (Bhattacharya et al, 2011; Kalinina et al, 2002; Legrand-Abravanel et al, 2007; Lindenbach & Rice, 2005; Morel et al, 2010; Noppornpanth et al, 2006; Pietschmann et al, 2006).

6. La protéine NS3

La protéine NS3 (aa 1027 à 1657) porte deux fonctions enzymatiques. Le premier tiers N-terminal possède une fonction de protéase à sérine, alors qu'une activité hélicase/NTPase est portée par les deux tiers carboxy-terminaux, ces deux parties fonctionnant d'une manière indépendante. Cependant des études récentes suggèrent que chaque partie est capable de moduler l'activité biochimique de l'autre (Beran et al, 2009; Beran & Pyle, 2008).

Le domaine sérine protéase de NS3 appartient à la superfamille des chymotrypsines (Grakoui et al, 1993b; Love et al, 1996) et il est associé au co-facteur NS4A (Failla et al, 1994) (Figure 15). En effet ce dernier permet de stabiliser et de structurer la région N-terminale de NS3 d'une part et d'activer d'autre part le clivage entre NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Bartenschlager et al, 1995). Exprimée seule, la protéine NS3 a une localisation diffuse au sein de la cellule. Son interaction avec NS4A lui permet également d'être adressée au niveau de la membrane du RE (Wolk et al, 2000). L'activité protéasique de NS3 lui permet de jouer un rôle antagoniste au niveau des défenses antivirales innées de la cellule. En effet, en clivant les protéines cellulaires TRIF et MAVS, responsables de la reconnaissance des ARN double-brin, elle court-circuite les voies de signalisation RIG-I et TLR3 (Cheng et al, 2006; Ferreon et al, 2005; Foy et al, 2003; Li et al, 2005b; Loo et al, 2006).



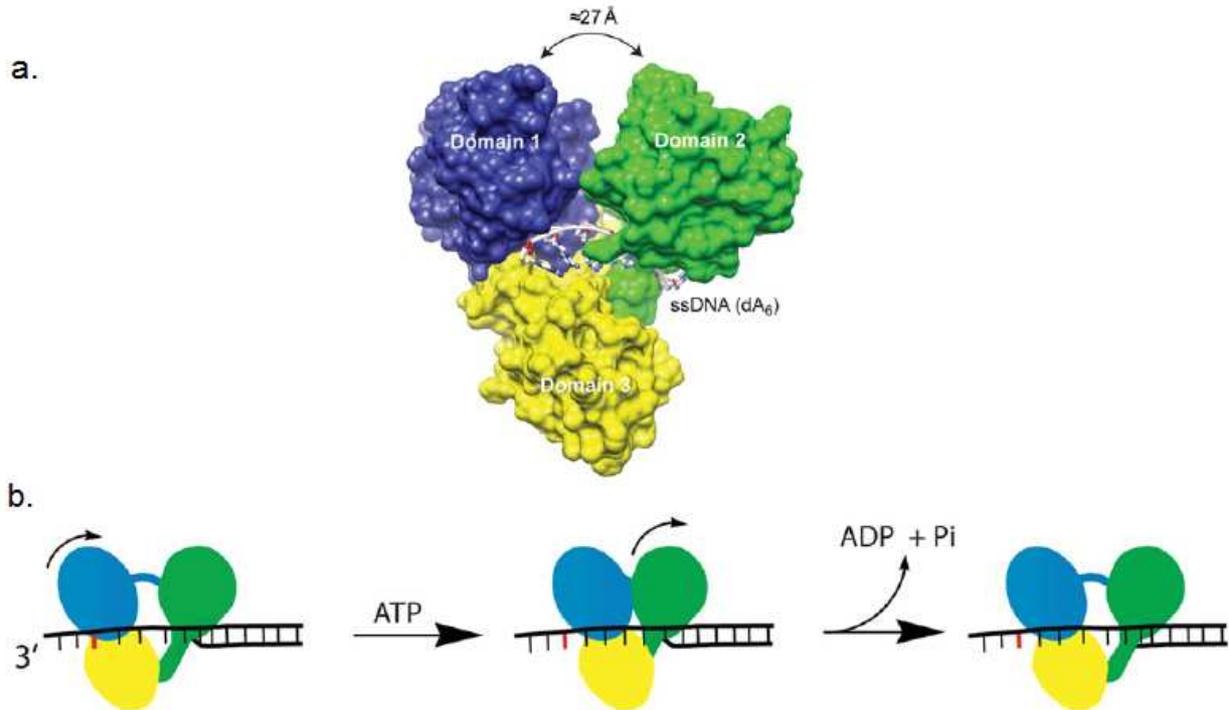
(D'après (Raney et al, 2010))

Figure 15 : Structure 3D du domaine protéase de NS3 en complexe avec NS4A et un peptide.

La partie N-terminale de la protéine NS3 porte l'activité protéasique et elle est représentée ici en rouge. Elle s'associe avec la protéine NS4A (en violet). Un peptide (en gris) est représenté ici au niveau du site actif de ce complexe enzymatique, entre les positions P2' et P4.

Le carré d'agrandissement en haut représente le domaine de liaison au zinc. Le carré d'agrandissement situé à gauche représente la triade catalytique, et enfin le carré d'agrandissement situé à droite représente l'emplacement pour l'oxyanion qui intervient au niveau de la stabilisation du complexe enzymatique pendant le clivage peptidique.

La fonction hélicase de NS3 lui permet de dérouler les complexes ARN-ARN, l'énergie nécessaire à cette activité étant fournie grâce à une hydrolyse de l'ATP (Kim et al, 1995; Tai et al, 1996). La partie hélicase de NS3 est également capable de dérouler les complexes ADN-ADN. Cette partie est constituée de trois sous-domaines de taille équivalente et disposée en « Y » (Kim et al, 1998; Yao et al, 1997) (Figure 16). La forme monomérique de NS3 peut lier l'ARN, cependant, l'association en dimère de cette protéine est nécessaire pour dérouler les duplexes d'ARN (Serebrov & Pyle, 2004). Il est à noter que différents facteurs interviennent pour rendre cette activité plus efficace. Tout d'abord le domaine protéase module l'activité hélicase de la protéine NS3 (Beran et al, 2007) et dans ce contexte le déroulement des duplexes de molécules d'acides nucléiques est plus rapide. De même cette activité se déroule plus rapidement en présence de la protéine NS4A. Celle-ci module également la fonction hélicase de NS3 (Pang et al, 2002). Enfin, les ions Mn^{2+} augmentent de manière significative l'activité hélicase de NS3 (Belon & Frick, 2009).



(D'après (Raney et al, 2010))

Figure 16 : Structure 3D de la partie Hélicase de NS3 et son mécanisme de fonctionnement.

(a.) Représentation de la structure de la partie hélicase de NS3 (NS3h), les domaines 1, 2 et 3 sont représentés respectivement en bleu, vert et jaune.

(b.) Modèle du mécanisme de translocation de NS3h lors du déroulement de molécules d'ADN ou d'ARN. La liaison de l'ATP amène les domaines 1 et 3 à se déplacer dans le sens 3' vers 5' du brin guide, libérant ainsi un nucléotide du site de liaison. L'hydrolyse de l'ATP permet ensuite au domaine 2 de se déplacer à son tour, NS3h retrouvant ainsi sa position d'origine.

Ainsi l'activité hélicase interviendrait au niveau de la séparation des duplexes d'ARN viral, pour faciliter la réplication. Elle permettrait également d'éliminer les structures secondaires de l'ARN ou de dissocier les protéines de l'ARN pour faciliter la réplication et ou la traduction virale.

NS3 est nécessaire à la réplication du HCV, mais elle intervient également au niveau de l'assemblage des particules virales, ayant ainsi un rôle en ce qui concerne la morphogénèse et l'infectiosité du virus. Le mécanisme impliqué dans ce phénomène n'a pas encore été clairement identifié. Une étude récente a toutefois montré que le couple NS3/NS4A interagit avec la protéine cellulaire YB-1 (Y-Binding 1) pour réguler la balance entre l'activité de réplication de HCV et la production de particules virales (Chatel-Chaix et al, 2011). De plus, certaines mutations au sein de cette protéine sont indispensables à l'adaptation de chimères intergénomiques de HCV (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007). Enfin, à la vue du rôle que joue NS3 dans le cycle viral, cette protéine est une bonne cible thérapeutique pour le développement de nouveaux antiviraux (De Francesco & Migliaccio, 2005; Raney et al,

2010). Récemment deux inhibiteurs de cette protéine virale, le Boceprevir et le Telaprevir, ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis (FDA, 2011a; FDA, 2011b).

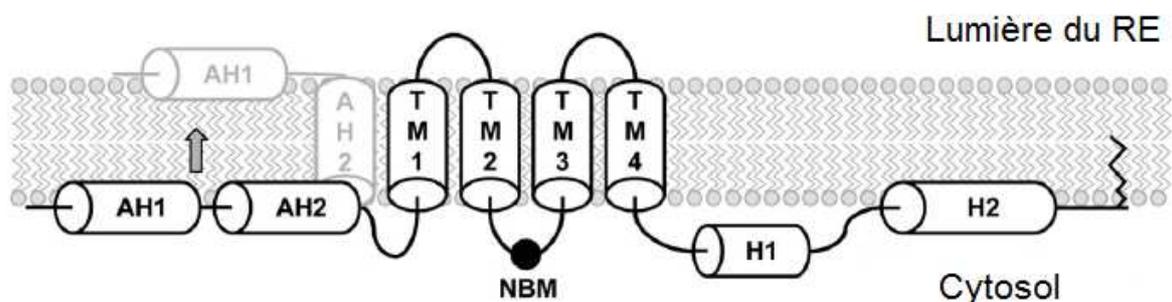
7. La protéine NS4A

NS4A est la plus petite des protéines non structurales de HCV (aa 1658 à 1711). Comme expliqué précédemment, cette protéine joue le rôle de co-facteur de la protéase NS3. Elle permet également d'augmenter l'activité hélicase de cette même protéine. NS4A est ancrée dans la membrane du RE. Sa partie N-terminale interagit avec NS3, contribuant ainsi à sa localisation au RE. Enfin, sa partie C-terminale permet de réguler l'hyperphosphorylation de NS5A et par là même joue un rôle dans la réplication virale (Lindenbach et al, 2007).

8. La protéine NS4B

NS4B (aa 1712 à 1972) est une protéine hydrophobe. Elle possède quatre passages transmembranaires (Hugle et al, 2001) et ses extrémités N- et C-terminales possèdent chacune deux hélices α , qui sont localisées au niveau du cytosol (Elazar et al, 2004; Gouttenoire et al, 2009) (Figure 17). L'extrémité N-terminale est détectable dans la lumière du RE après translocation (Lundin et al, 2003). La protéine exprimée seule, ou en fusion avec la GFP, est d'ailleurs localisée au niveau des membranes du RE (Gretton et al, 2005).

La protéine NS4B induit la formation de structures membranaires qui se présentent alors sous la forme d'un réseau de membranes (membranous web) (Egger et al, 2002). Les complexes de réplication de HCV sont associés à ce réseau membranaire (Gosert et al, 2003). L'induction des modifications membranaires semble d'ailleurs liée à l'événement de translocation décrit précédemment (Lundin et al, 2006).



(Adapté d'après (Paul et al, 2011))

Figure 17 : Représentation de la topologie de NS4B

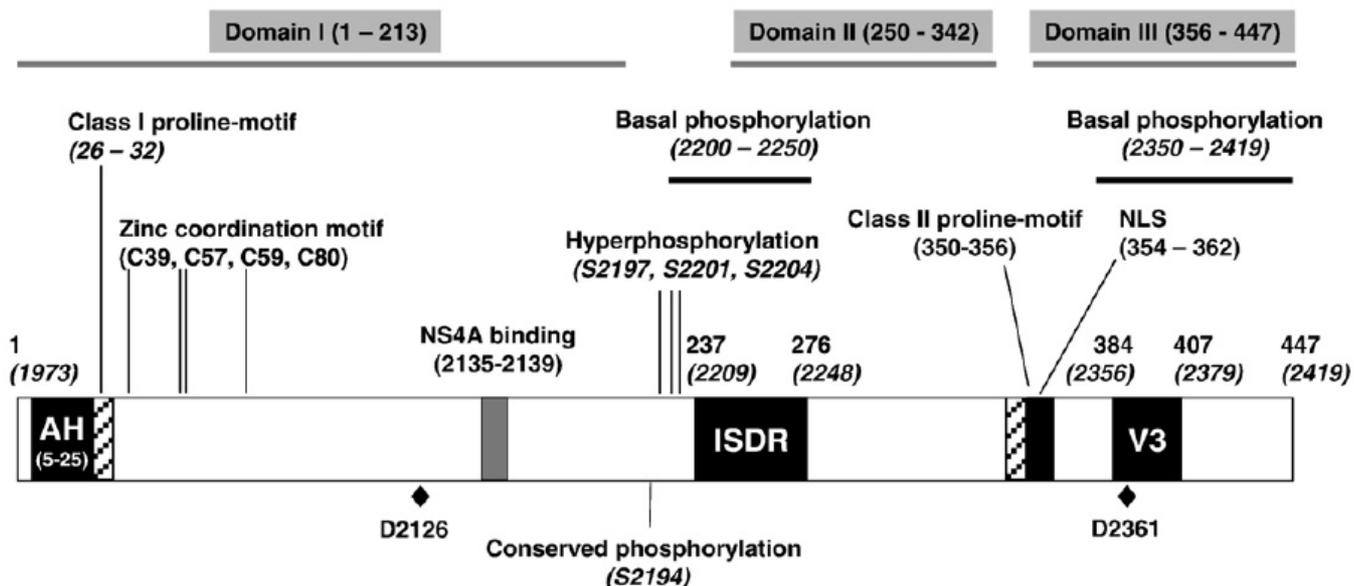
AH : hélice α amphipathique de la région N-Terminale ; TM : Domaine Transmembranaire ; NBM : motif de liaison aux nucléotides ; H : hélice α de la région C-Terminale.

Par ailleurs plusieurs travaux révèlent l'importance de cette protéine dans la réplication de HCV. En effet, cette protéine est sujette à des modifications post-traductionnelles, comme notamment la palmitoylation des cystéines en position 257 et 261 de la protéine, permettant ainsi à NS4B de former des oligomères. Ce processus semble jouer un rôle important dans la formation des complexes de réplication (Yu et al, 2006). De plus il est rapporté que NS4B possède une activité NTPasique localisée dans sa partie N-terminale. Cette activité enzymatique lui permet d'hydrolyser l'ATP ou le GTP, ce qui est indispensable à la réplication virale (Einav et al, 2004; Thompson et al, 2009). Des variations dans la séquence de la protéine ou des mutations à ses extrémités N- et C-terminales ont un effet sur l'efficacité de la réplication virale (Aligo et al, 2009; Blight, 2007; Blight, 2011; Paul et al, 2011).

NS4B est un des composants du complexe de réplication, de ce fait elle interagit avec les autres protéines de ce complexe (Dimitrova et al, 2003; Piccininni et al, 2002) et elle module, entre autre, l'hyperphosphorylation de NS5A (Koch & Bartenschlager, 1999), comme probablement son incorporation au niveau des sites de réplication (Blight, 2011). Enfin il a récemment été rapporté que NS4B intervenait également au niveau de la production des particules virales (Jones et al, 2009).

9. La protéine NS5A

La protéine NS5A (aa 1973 à 2420) est une phosphoprotéine hydrophobe, riche en prolines, que l'on retrouve sous deux formes : une forme phosphorylée (56 kDa) et une forme hyperphosphorylée (58 kDa). Cette protéine est capable de lier l'ARN (Huang et al, 2005). Le caractère hydrophobe de la partie N-terminale de cette protéine lui permet d'être associée aux membranes du RE ou aux GLs. Les 30 premiers aa de NS5A forment une hélice α amphipathique très conservée permettant cette association (Brass et al, 2002; Elazar et al, 2003; Penin et al, 2004). Il est à noter que NS5A peut être clivée à différents endroits par certaines caspases, générant ainsi des formes tronquées localisées au niveau du cytosol (Kalamvoki et al, 2006). En dehors de son hélice amphipathique, cette protéine possède 3 domaines qui sont séparés par des séquences de faibles complexités (Figure 18).



(Adapté d'après (Huang et al, 2007b))

Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines de NS5A et des fonctions qui y sont associées.

Le domaine I (aa 1973 à 2186) est composé de deux sous-domaines. Tout d'abord le sous-domaine IA : il est situé juste après l'hélice α et il est riche en aa basiques. En se liant à quatre cystéines très conservées, ce domaine fixe un ion zinc essentiel à la structure de la protéine et à la réplication du génome viral (Tellinghuisen et al, 2004; Tellinghuisen et al, 2005). Le sous-domaine IB est quant à lui riche en aa acides et il forme des homodimères par contact entre les extrémités N-terminales du sous-domaine IA. Cette homodimérisation permet la formation d'une gouttière basique, orientée vers le cytosol et capable de lier l'ARN (Figure 18).

Le domaine II (aa 2223 à 2315) possède certains aa essentiels à la réplication de l'ARN viral (Tellinghuisen et al, 2008b). Ce domaine joue également un rôle dans la résistance du virus à l'IFN. Il contient en effet une bonne partie de la région déterminant la sensibilité à l'IFN (ISDR). Il s'agit d'un motif d'une quarantaine d'aa conservée parmi les isolats de HCV résistants à l'IFN (Enomoto et al, 1995). Il est suggéré que cette séquence ISDR interagisse avec la partie C-terminale de NS5A pour bloquer l'action de l'IFN (Nousbaum et al, 2000), notamment en régulant l'activité de la PKR, qui est un des médiateurs de la réponse antivirale par IFN (Gale et al, 1998a; Gale et al, 1998b) (Figure 18).

Le domaine III (aa 2329 à 2420) joue quant à lui un rôle important dans l'assemblage des nouveaux virions (Appel et al, 2008), en interagissant avec la protéine core (Masaki et al, 2008). De plus il a été montré que ce domaine supporte de larges insertions ou délétions sans

perturber l'étape de réplication du virus (Appel et al, 2005; Liu et al, 2006; Moradpour et al, 2004b) (Figure 18).

La protéine NS5A existe sous deux formes, la première possède un niveau basal de phosphorylation (p56), la seconde est hyperphosphorylée (p58). La phosphorylation de NS5A intervient dans une région riche en sérine située au milieu de cette protéine et près de son extrémité C-terminale. L'hyperphosphorylation est notamment dépendante de la présence d'autres protéines non-structurales de HCV comme NS4A (Asabe et al, 1997; Kaneko et al, 1994). Dans des cellules portant un replicon, la forme p58 a une durée de demi-vie plus courte que la p56, suggérant un rôle différent pour les deux formes de cette protéine (Pietschmann et al, 2001). L'introduction de mutations ou l'utilisation d'inhibiteurs de kinases cellulaires, ayant pour objectif de réduire la phosphorylation de NS5A, permettent d'augmenter la réplication de l'ARN viral (Appel et al, 2005; Neddermann et al, 2004). De plus l'interaction entre hVAP-A, une protéine nécessaire à la réplication de HCV, et NS5A est bloquée lorsque celle-ci est sous la forme p58 (Evans et al, 2004). Ces données indiquent une corrélation inverse entre l'hyperphosphorylation et la réplication. Des études récentes ont mis en évidence que la phosphorylation de certaines sérines situées dans la partie C-terminale de NS5A sont importantes pour la production de particules virales infectieuses (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008; Tellinghuisen et al, 2008a). Cela montre l'importance du domaine III de cette protéine dans la morphogénèse de HCV. Ainsi NS5A régulerait la balance entre assemblage des particules virales et réplication du génome HCV.

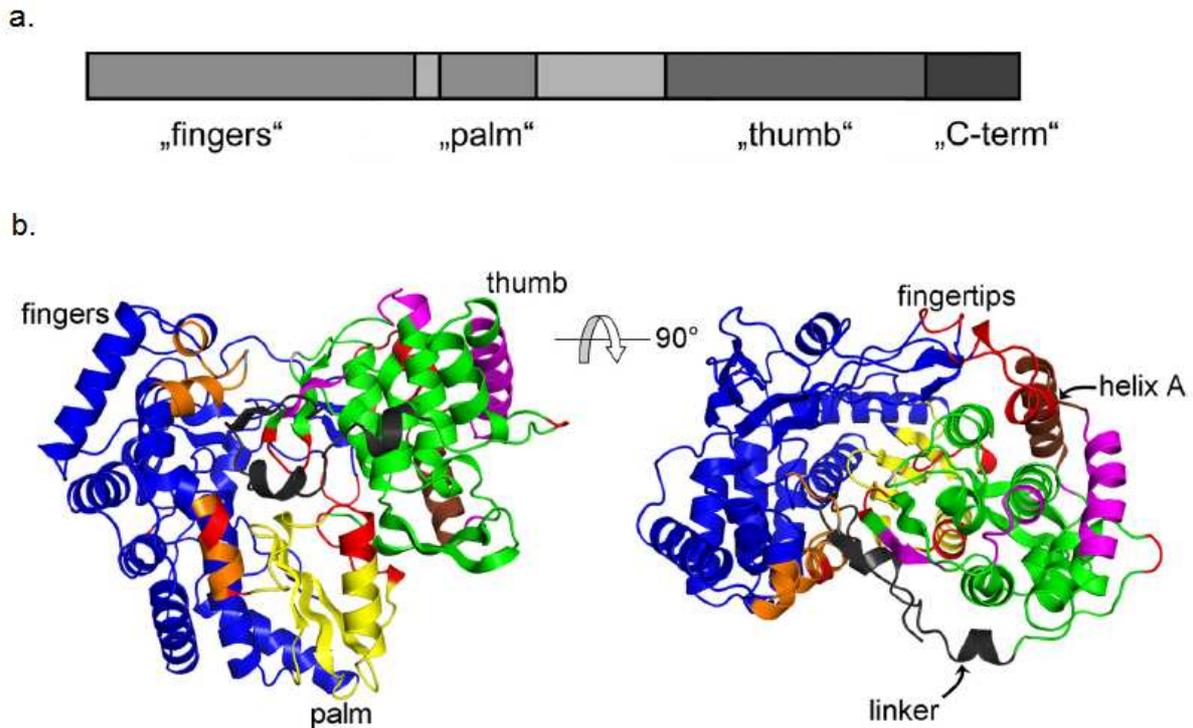
En plus de son rôle au niveau du cycle viral, la protéine NS5A est également connue pour agir sur différentes voies de la signalisation cellulaire. Comme précisé plus haut, NS5A est capable de moduler l'activité de la PKR et d'avoir ainsi un effet sur la réponse antivirale par l'IFN. De plus il a été montré *in vivo* que NS5A pouvait nuire à la réponse immunitaire innée et adaptative en inhibant l'induction de l'IFN β , la 2'-5' oligoadénylate synthétase, la PKR et les lymphocytes T cytotoxiques (Kriegs et al, 2009). Par ailleurs l'expression des TLR-4 peut être inhibée par NS5A et donc agir sur la voie d'apoptose que ces récepteurs dirigent (Tamura et al, 2011). Cette protéine inhibe également l'induction de l'apoptose en interagissant avec d'autres protéines cellulaires impliquées dans ce phénomène (Wang et al, 2006). Enfin NS5A est capable d'augmenter l'expression du gène PPAR- γ qui est impliqué dans l'homéostasie lipidique. Cela conduit NS5A à induire l'accumulation de lipides au niveau des cellules hépatiques (Kim et al, 2009).

10. La protéine NS5B

NS5B (aa 2421 à 3011) est une protéine membranaire de 68 kDA. Elle est l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) de HCV (Behrens et al, 1996). Elle comporte le motif GDD (Gly-Asp-Asp), conservé dans la famille des RdRp (Lohmann et al, 1997; Poch et al, 1989). La partie C-terminale de cette protéine est constituée de 21 aa hydrophobes formant une hélice α transmembranaire, responsable de l'ancrage de NS5B à la membrane du RE (Ivashkina et al, 2002; Schmidt-Mende et al, 2001). L'association membranaire est importante pour la réplication de l'ARN viral (Moradpour et al, 2004a). La partie enzymatique de cette protéine est portée par les 531 aa de la région N-terminale (Bressanelli et al, 1999).

Les analyses structurales de cette protéine ont révélé qu'elle a une structure tridimensionnelle analogue à celle décrite pour d'autres ARN polymérases. Elle possède une forme de main droite possédant trois sous-domaines : la « paume », les « doigts » et le « pouce » (Bressanelli et al, 1999; Lesburg et al, 1999) (Figure 19). Les « doigts » ont de multiples interactions avec le « pouce », ce qui entraîne la formation d'un tunnel menant le simple brin d'ARN directement au site actif localisé au niveau de la « paume ». Les NTPs nécessaires à la synthèse d'un nouveau brin d'ARN accèdent au site actif par un autre tunnel chargé positivement.

Des études récentes, portant sur l'analyse des différences entre la polymérase NS5B du JFH1 et celle des autres souches virales de HCV, ont permis de déterminer ce qui confère la haute efficacité de réplication de la souche JFH1. Cette spécificité est en partie due à une conformation plus fermée de la forme de main droite qu'adopte NS5B (Simister et al, 2009). Par la suite il a été observé que cette conformation est due à des différences au niveau de la séquence en aa de NS5B. Ces différences, situées à des points clés de la séquence protéique, permettent d'augmenter grandement l'efficacité de la polymérase NS5B, appartenant à d'autres souches de HCV, lorsqu'elles y sont introduites (Schmitt et al, 2011).



(Adapté d'après (a.) (Schmitt et al, 2011) ; (b.) (Simister et al, 2009))

Figure 19 : Présentation de la polymérase NS5B de HCV.

(a.) Représentation des différents domaines de la protéine NS5B.

(b.) Structure 3D de la protéine NS5B sous deux angles différents. Le site catalytique est formé par les domaines « fingers », « thumb » et « palm » indiqué sur l'image de gauche. A droite la même protéine, ayant subi une rotation d'un angle de 90°.

La protéine NS5B interagit également avec d'autres protéines de HCV. Tout d'abord l'activité ARN polymérase de cette protéine dépend de son interaction avec NS3 et NS5A (Bartenschlager et al, 2004). De plus NS5A module l'activité ARN polymérase de NS5B et cela d'une manière dose-dépendante (Shirota et al, 2002).

L'interaction de la protéine NS5B avec différents facteurs cellulaires a pu être rapportée. Une étude récente indique que NS5B perturbe le cycle cellulaire, en relocalisant une protéine d'interaction avec la kinase cycline dépendante 2 (CINP) au niveau du cytoplasme (Wang et al, 2011). D'autres protéines cellulaires interviennent également dans la réplication de HCV en interagissant avec NS5B. Ainsi, différents travaux suggèrent une interaction entre les cyclophilines et la protéine NS5B qui auraient pour effet de favoriser l'activité de liaison à l'ARN de cette protéine. Certaines études montrent que ce phénomène se déroule en présence de cyclophiline B (Watashi et al, 2005). Cependant, d'autres travaux montrent l'implication de la cyclophiline A dans la réplication virale et privilégient par conséquent celle-ci (Kaul et al, 2009). Enfin il a été montré que la protéine kinase PRK2 est nécessaire à la phosphorylation de NS5B, ce qui augmente également la réplication du génome virale (Kim et al, 2004).

IV. Les modèles d'étude de HCV

Le clonage et le séquençage complet du génome de HCV ont permis dans un premier temps de mener une analyse rapide de l'organisation génomique de ce virus, ainsi qu'une caractérisation biochimique de ses protéines. Néanmoins l'absence d'un système cellulaire permettant l'amplification et la propagation de HCV a été, pendant plus de quinze ans, un obstacle majeur dans l'étude du cycle infectieux de ce virus.

Initialement, une grande partie des études portant sur le HCV a été menées de deux manières différentes : d'une part à partir d'échantillons cliniques, d'autre part par l'infection expérimentale de chimpanzés par du virus isolé à partir de sera de patients. Différents modèles ont ensuite été développés pour permettre l'étude de ce pathogène aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ceux-ci ont permis d'étudier aussi bien différentes étapes du cycle viral que de caractériser différentes interactions du virus avec son hôte. Les approches variées se sont révélées très utiles avant la mise au point du système de culture de HCV (HCVcc) en 2005, notamment en ce qui concerne les modèles de replicons, pour la réplication, ou les particules rétrovirales pseudotypées contenant les protéines d'enveloppe de HCV (HCVpp), pour l'étude de l'entrée virale.

A. Les modèles animaux

Le HCV n'infecte naturellement que les humains. Aucune infection naturelle n'a pu être détectée chez d'autres espèces animales. Du point de vue expérimental, le chimpanzé est le seul animal infectable de façon stable et reproductible. Initialement des sera de patients étaient inoculés pour étudier les cas d'hépatites « Non-A Non-B » post-transfusionnelles (Alter et al, 1978; Hollinger et al, 1978). Par la suite l'ARN du HCV, transcrit *in vitro* à partir d'un ADNc, a été inoculé à cet animal pour tenter de reproduire une infection virale (Kolykhalov et al, 1997; Shimizu et al, 1998; Yanagi et al, 1997).

Le chimpanzé, infecté par le HCV, présente des signes cliniques et une évolution de l'infection analogue à ce qui est observé chez l'humain. L'ARN viral est comparablement détectable quelques jours après l'infection, est suivi de la même façon d'une augmentation des transaminases sériques, et, enfin, les réponses immunitaires cellulaires et humorales sont semblables aux réponses de ce type chez l'homme. Par conséquent l'infection de cet animal a permis de réaliser de nombreux travaux pour étudier l'infectiosité, la progression de la maladie, la réponse immunitaire innée et adaptative, ainsi que pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. Cependant, l'utilisation du chimpanzé reste limitée à cause de sa

rareté, du coût de son entretien, mais également pour des raisons évidentes d'éthique (Grakoui et al, 2001; Koike et al, 2010).

D'autres modèles d'animaux ont été utilisés pour étudier le HCV, parmi lesquels on peut citer les souris xénogreffées. Ce modèle est nettement moins coûteux et beaucoup plus souple dans son utilisation. Il est développé à partir de souris immunodéprimées (SCID), dont le foie va être détruit suite à la surexpression d'un transgène activateur d'urokinase plasminogène, placé sous la dépendance du promoteur de l'albumine (Heckel et al, 1990). L'animal reçoit ensuite une greffe de cellules hépatiques humaines qui vont recoloniser le foie détruit précédemment. Ces souris peuvent dès lors être infectées par des sera de patients chroniquement infectés par HCV (Mercer et al, 2001). Ce modèle permet l'établissement d'une infection prolongée chez l'animal, ainsi que la production de particules virales infectieuses. C'est une méthode qui permet notamment d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules à visée thérapeutique ou l'activité neutralisante d'anticorps anti-HCV (Kneteman et al, 2006; Law et al, 2008; Meuleman et al, 2008; Vanwollegem et al, 2008). Ce modèle animal a également permis d'évaluer l'infectiosité *in vivo* de chimères intergénomiques (Pietschmann et al, 2009). Les difficultés techniques liées à la mise en place de cette méthode, ainsi que son coût, limitent toutefois son utilisation. Une autre approche a été explorée avec des résultats encourageants. Elle consiste en l'adaptation de HCV aux cellules de souris (Bitzegeio et al, 2010; Ploss et al, 2009). Ceci permettrait d'utiliser ce petit animal comme modèle d'étude plus complet. Cependant une étude récente montre que l'humanisation des récepteurs impliqués dans le processus d'entrée de HCV ne permet pas d'obtenir une infection dans les hépatocytes murins (Hikosaka et al, 2011). Néanmoins une autre étude rapporte la mise au point d'un modèle murin génétiquement humanisé capable de supporter le cycle viral complet de HCV (Dorner et al, 2011).

B. Les modèles cellulaires

Pendant longtemps, l'étude de HCV a été handicapée par l'absence d'un système cellulaire permettant au virus de se répliquer et de se propager dans des cellules hôtes. Ainsi, différents outils ont été mis au point, dans le but soit d'étudier une étape précise du cycle viral (la réplication par exemple), soit d'avoir un modèle permettant l'étude complète du cycle de HCV.

1. Cellules infectées par le HCV isolé de sera de patients

Les hépatocytes étant considérés comme la cible naturelle de HCV *in vivo*, les premiers essais pour établir un système cellulaire d'étude de ce virus ont été la culture de cellules provenant de patients chroniquement infectés par HCV. Il a été ainsi montré que la réplication de HCV et la production de particules virales infectieuses avaient bien lieu au sein des hépatocytes primaires provenant de patients infectés (Ito et al, 1996). D'autres études visaient à infecter des cultures d'hépatocytes primaires d'humains ou de chimpanzés (Fournier et al, 1998; Lanford et al, 1994; Rumin et al, 1999). Même si ces deux approches ont l'avantage de refléter au mieux le comportement *in vivo* de HCV au niveau de la cellule, ces systèmes n'ont donné que des résultats peu reproductibles et n'ont permis qu'une faible réplication ainsi qu'une propagation virale limitée.

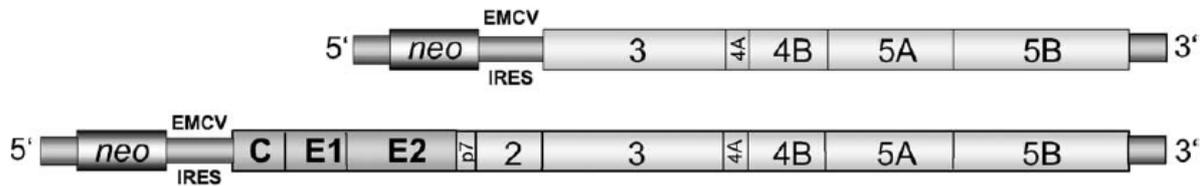
HCV se transmettant par voie parentérale, des études analogues ont également été menées sur des cellules mononucléées du sang (CMS). Ces travaux ont montré que HCV est capable d'infecter et de se répliquer au sein de ces cellules (Cribier et al, 1995; Muller et al, 1993). Toutefois, les taux de production virale étaient trop faibles pour que ce modèle puisse servir à l'étude du cycle viral.

Enfin, des essais de propagation de HCV ont été menés avec différentes lignées cellulaires. Les essais ont été réalisés d'une part sur des cellules dérivées de lymphocytes humains T (MOLT-4 et MT2) et B (Daudi) (Hijikata et al, 1995; Kato et al, 1995; Shimizu et al, 1992) et d'autre part des lignées hépatocytaires PH5H et Huh-7 (Kato et al, 1996; Seipp et al, 1997). Ces travaux ont montré que les différentes lignées sont permissives à une infection par HCV. Cependant, avec ce type de méthode, le niveau de réplication est faible et difficile à mettre en évidence.

2. Les réplicons sous-génomiques et génomiques

Les réplicons génomiques et sous génomiques ont été développés afin de pouvoir étudier l'étape de réplication de HCV. Un réplicon constitue une unité de réplication, comportant au moins les protéines non-structurales nécessaires et suffisantes à la constitution du complexe de réplication, et au plus l'intégralité du génome de HCV, les protéines structurales pouvant interagir avec tout ou partie du complexe de réplication (Figure 20). Cette unité de réplication est généralement portée par un ARN bicistronique. Un gène de sélection, la plupart du temps un gène de résistance à la néomycine, est placé sous la dépendance de l'IRES HCV. A la suite de ce gène les protéines de HCV sont placées sous la

dépendance de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Figure 20). Ces réplicons sont capables de se répliquer efficacement au sein de cellules de la lignée Huh-7 (Ikeda et al, 2002; Lohmann et al, 1999).



(Adapté d'après (Bartenschlager et al, 2003))

Figure 20 : Représentation schématique de réplicons de HCV.

Les réplicons sont constitués d'une séquence d'ARN codant un marqueur de sélection (ici est présenté le gène de résistance à la néomycine) sous la dépendance de l'IRES de HCV puis d'une séquence codant tout ou une partie des protéines de HCV, placé sous la dépendance de l'IRES de l'EMCV. Le tout est encadré par les régions 5' et 3' UTR de HCV.

Le réplicon sous-génomique (en haut) ne porte que la séquence codant les protéines NS3 à NS5B, alors que le réplicon génomique porte la séquence codant l'ensemble des protéines de HCV.

La mise au point de cet outil a ainsi permis de déterminer et de visualiser le complexe de répllication viral, formé par les protéines NS3 à NS5B (Moradpour et al, 2004b). Toutefois, l'utilisation des réplicons génomiques demeure complémentaire ; les protéines structurales peuvent en effet être amenées à jouer un rôle sur certaines étapes de la répllication du fait de leurs interactions avec les protéines impliquées dans la formation du complexe de répllication viral.

Les études menées avec l'outil réplicon ont permis différentes avancées. Ainsi, certaines mutations d'adaptation à la culture cellulaire, influençant le niveau de répllication, ont été sélectionnées (Blight et al, 2000; Krieger et al, 2001). Des cellules exprimant un réplicon HCV ont été curées de celui-ci par l'administration de doses d'IFN α à des concentrations modérées. Cette approche a rendu possible la sélection de cellules hautement permissives à la répllication de HCV permettant à un réplicon de génotype 1a d'être plus répllicatif sur ces cellules. Cette nouvelle lignée cellulaire porte le nom de Huh7.5 (Blight et al, 2002). Plus tard, elle fut utilisée pour produire de meilleurs titres infectieux du HCV de génotype 2a (Zhong et al, 2005).

Cependant, ce système est confronté à un certain nombre de limitations. Ainsi, le comportement du complexe de répllication viral seul *in vitro* ne reflète pas complètement le comportement que peut avoir le virus au niveau de sa répllication *in vivo*. De plus les facteurs liés aux conditions de culture peuvent également avoir une influence sur les observations faites dans ce genre d'étude.

3. Pseudovirions et virosomes

Une autre approche adoptée pour étudier l'entrée du virus dans la cellule est de produire du matériel particulaire mimant les particules virales HCV. Différents outils ont ainsi été mis au point.

L'un de ces systèmes, appelé VLP (Virus Like Particles) (Baumert et al, 1998), est basé sur l'utilisation de baculovirus recombinants cultivés dans des cellules d'insectes et exprimant les protéines structurales de HCV. La fonction et la structure des protéines structurales de HCV, l'assemblage et l'encapsidation de l'ARN viral ont ainsi pu être abordés par cette approche (Choi et al, 2004; Clayton et al, 2002; Zhao et al, 2003). Cependant, les cellules d'insectes ne se comportent pas de la même manière que les cellules de mammifères, notamment au niveau de la glycosylation. Ainsi, celle-ci, essentielle au bon repliement des protéines d'enveloppe, impliquées dans l'entrée du virus, et prodiguant un rôle protecteur vis-à-vis des anticorps neutralisants (Goffard et al, 2005; Helle et al, 2007), ne produit pas les mêmes modifications chez les insectes que chez les mammifères. Ce qui introduit un biais important dans ce modèle d'étude.

Des virus pseudotypés du VSV (virus de la stomatite vésiculaire) exprimant les glycoprotéines E1 et E2 de HCV ont été mis au point (Buonocore et al, 2002; Lagging et al, 1998; Matsuura et al, 2001). Cependant, là encore, ce modèle crée un biais important pour les études à venir du fait de l'absence des domaines transmembranaires des glycoprotéines de HCV. En effet, il a été montré que ceux-ci jouaient un rôle essentiel dans l'hétérodimérisation de E1 et E2 et dans l'entrée du virus (Ciczora et al, 2005; Ciczora et al, 2007).

Un autre modèle reposant sur l'utilisation d'un réplicon du virus de la forêt de Semiliki (SFV) et exprimant les protéines structurales de HCV (Blanchard et al, 2002), a permis d'étudier les étapes initiales du bourgeonnement. Par la suite, la formation de particules virales au niveau du RE a pu être observée grâce à cet outil (Roingeard et al, 2004). Mais ce modèle ne conduisait pas à la production de particules infectieuses.

Enfin, une approche alternative, développée dans le but d'étudier les phases précoces de l'entrée virale, a été élaborée en incorporant les glycoprotéines E1 et E2 au sein de vésicules lipidiques de type liposome (Lambot et al, 2002). Cependant, ces virosomes sont difficiles à produire et leur utilisation en est par là restreinte.

4. Les particules rétrovirales pseudotypées HCV

La mise au point des différents outils décrits précédemment a ouvert la voie à une avancée importante en 2003. En effet, plusieurs équipes ont rapporté l'élaboration de particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe de HCV, les HCVpp. Il s'agit de particules virales constituées de la capsid d'un rétrovirus (MLV ou HIV) portant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 de HCV à sa surface et renfermant un ARN portant un gène rapporteur (GFP ou Luciférase) (Bartosch et al, 2003b; Drummer et al, 2003; Hsu et al, 2003). Par cet outil, les étapes de l'entrée de HCV dans les cellules cibles ont pu être abordées (Figure 21).

La production de HCVpp passe par la transfection de cellules embryonnaires de rein humain, les HEK-293T, par trois vecteurs d'expression. Le premier vecteur exprime les glycoprotéines E1 et E2 de HCV, le second exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du rétrovirus utilisé, alors que le troisième code un ARN viral portant un gène rapporteur flanqué de deux séquences LTR (Long Terminal Repeat). Cet ARN sera encapsidé dans les HCVpp car il est le seul à posséder la séquence d'encapsulation du génome rétroviral. Une fois les cellules HEK transfectées par ces 3 vecteurs d'expression, les HCVpp seront secrétées dans le milieu de culture cellulaire (Figure 21). La transduction du gène rapporteur aux cellules hôtes dépend des glycoprotéines de HCV présentes à la surface des particules. Le génome rétroviral recombinant, une fois libéré dans les cellules infectées, s'intégrera ensuite au génome de celle-ci. La quantification de l'expression du gène rapporteur permet alors d'évaluer l'infectiosité des pseudo-particules virales (Bartosch et al, 2003b; Drummer et al, 2003; Hsu et al, 2003) et donc de définir qu'elles sont les cellules les plus permissives à ces particules.

Le tropisme préférentiel de ces particules pour les cellules hépatiques, leur neutralisation spécifique par des anticorps monoclonaux neutralisants (Bartosch et al, 2003a; Bartosch et al, 2003b; Lavillette et al, 2005b; Meunier et al, 2005), en ont fait un des outils le plus proche des particules virales de HCV. Outre l'étude des différentes étapes d'entrée de HCV, ce modèle a également contribué à mieux caractériser les récepteurs potentiels de HCV ainsi que les mécanismes liés à l'entrée du virus (Bartosch et al, 2003c; Blanchard et al, 2006).

Toutefois, il est à noter que ce modèle ne reflète pas totalement le comportement du HCV. Au niveau de l'assemblage des particules, par exemple, là où pour le HCV cette étape dépend des VLDL (Huang et al, 2007a), l'assemblage des HCVpp semble être associé aux

corps multivésiculaires (Sandrin et al, 2005). Ce qui confine cet outil à l'étude de l'étape de l'entrée virale.

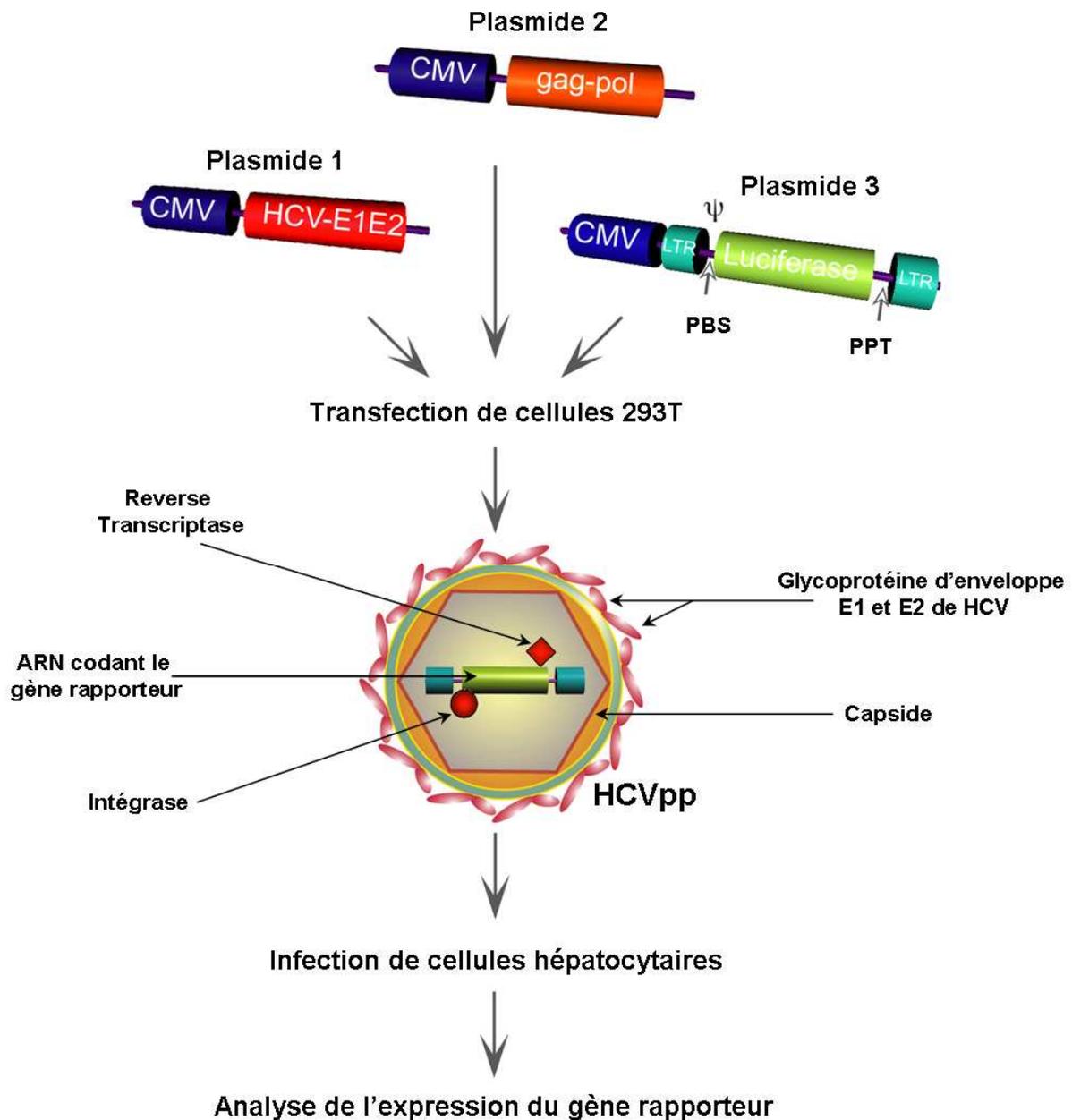


Figure 21 : Représentation schématique de la production de HCVpp.

Trois vecteurs d'expression sont utilisés pour transfecter des cellules HEK-293T. Le premier code les protéines d'enveloppe E1 et E2 de HCV. Le second exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus (MLV ou HIV) (Matrice, Capside, Nucléocapside, Protéase, Reverse Transcriptase, et Intégrase). Le dernier exprime le génome rétroviral contenant un gène rapporteur.

Le génome rétroviral contient les séquences nécessaires à la reverse transcription et à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte (LTR, PBS, PPT). Les protéines de matrice, capside et nucléocapside permettent l'encapsidation de ce génome viral grâce au signal d'encapsidation ψ , l'assemblage de la particule rétrovirale et son bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique.

Les particules rétrovirales HCVpp portant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont sécrétées dans le surnageant de culture des cellules transfectées. Elles seront utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires. Les cellules ainsi infectées intègrent le gène rapporteur au sein de leur génome, grâce à l'action de la reverse transcriptase et de l'intégrase. Dès lors, l'expression de ce gène permettra de quantifier l'infectiosité de ces HCVpp.

5. Production de particules HCV en culture cellulaire

La plus grande avancée en terme d'étude de HCV fut la mise au point d'un système de propagation de HCV en culture cellulaire en 2005 (appelé HCVcc) (Lindenbach et al, 2005; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005). Cet outil est basé sur la transfection d'un génome viral infectieux au sein de cellules d'hépatocytes.

a) *Élaboration du système HCVcc*

La mise au point de ce système débute en 2001, avec le clonage d'un isolat de génotype 2a de HCV, provenant d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante. Cette souche a été baptisée JFH-1 (pour Japanese Fulminant Hepatitis-isolate 1) (Kato et al, 2001). Des réplicons subgénomiques ont été construits à partir de cet isolat. Il s'est avéré que ces réplicons étaient capables de se propager efficacement sur les cellules Huh-7 sans mutations d'adaptation (Kato et al, 2003), comme ce fut le cas pour d'autres réplicons (Blight et al, 2000; Krieger et al, 2001). Partant de cet isolat, l'équipe de Wakita a cloné l'ADN complémentaire de l'intégralité du génome viral JFH-1, sous la dépendance du promoteur T7 au sein d'un vecteur, et permettant ainsi de préparer le génome viral par transcription *in vitro*. Une fois l'ARN viral du JFH-1 préparé, celui-ci est transféré dans les cellules de la lignée Huh-7 par électroporation. Le surnageant de culture s'est alors révélé infectieux sur des cellules Huh-7 naïves indiquant sa propagation en culture cellulaire (Wakita et al, 2005) (Figure 22). En parallèle, d'autres groupes ont rapporté que l'utilisation d'une chimère intragénotypique, entre la souche J6 et la souche JFH-1, permettait également de reproduire le cycle viral complet de HCV *in vitro* (Lindenbach et al, 2005).

Les HCVcc se sont révélés infectieux sur des hépatocytes primaires humains, sur les modèles animaux tels que le chimpanzé ou la souris humanisée. Par ailleurs, des cellules Huh-7 naïves ont été réinfectées par le sérum de chimpanzé infecté à partir de HCVcc produit *in vitro* (Lindenbach et al, 2006; Molina et al, 2008; Wakita et al, 2005). En outre, les particules virales ont été neutralisées par des anticorps dirigés contre E2 ou par des séras de patients infectés (Lindenbach et al, 2006; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005).

Les propriétés biophysiques des particules virales ainsi produites ont été analysées et se sont révélées analogues aux propriétés des particules isolées de patients ou de chimpanzé. Le diamètre des particules a été évalué entre 50 et 65 nm, grâce à des observations par microscopie électronique. De plus, leur densité est variable, mais le pic spécifique lié à l'infection est situé entre 1,09 et 1,11 g/ml (Lindenbach et al, 2006; Wakita et al, 2005; Zhong

et al, 2005). Ces particules sont souvent associées aux lipoprotéines qui modulent leur densité et par extension leur sécrétion et leur infectiosité (Chang et al, 2007). Enfin la taille des particules intracellulaires semble équivalente à celles des particules extracellulaires, leur densité étant toutefois différente (Gastaminza et al, 2006).

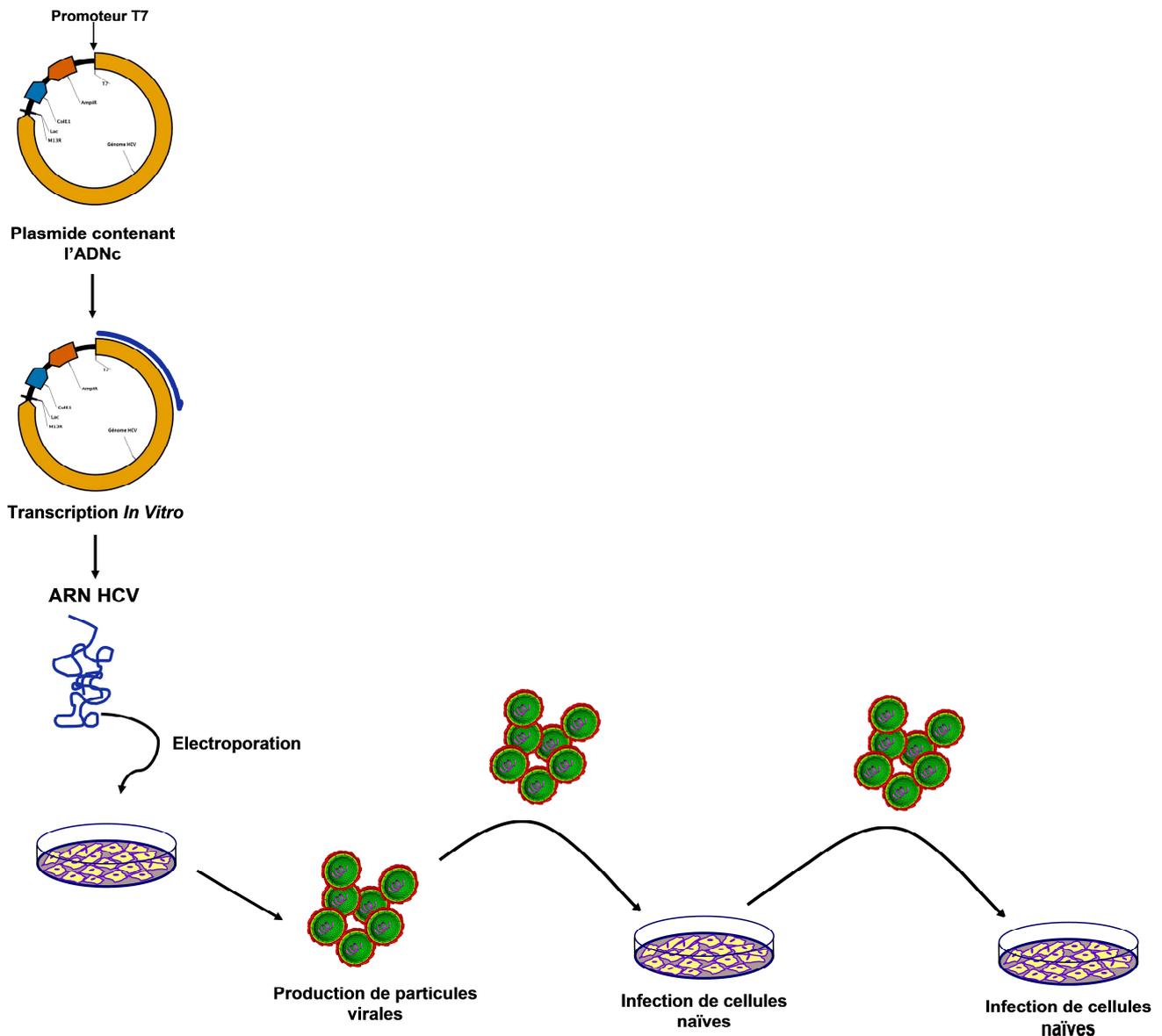


Figure 22 : Représentation schématique du principe de production de HCVcc.

L'ADNc du génome HCV est porté par un plasmide sous la dépendance du promoteur T7. L'ADN est ensuite transcrit *in vitro* en ARN viral grâce à la T7 RNA polymérase. Cet ARN est ensuite électroporé au sein de cellules de la lignée hépatocytaire Huh-7. Les cellules transfectées sont alors capables de produire des particules virales infectieuses du HCV. Les particules virales sécrétées dans le surnageant de culture sont capables d'infecter des cellules naïves. Cette infection permet alors d'étudier le cycle viral complet. Enfin il est possible d'amplifier le stock viral par la réalisation d'infections successives.

b) Amélioration des HCVcc

En raison du faible titre viral, différentes méthodes ont été utilisées en vue d'améliorer la production et l'infectiosité des particules virales. La lignée hautement permissive à la

réplication du réplicon 1a (Blight et al, 2002) a été initialement utilisée pour améliorer la production virale du JFH-1. Il a été montré que la haute permissivité de cette lignée à la réplication virale serait liée à une altération de la voie de signalisation antivirale lié à RIG-I qui serait mutée au sein des cellules Huh7.5 (Sumpter et al, 2005). Des titres infectieux plus conséquents sont ainsi obtenus sur ces cellules par comparaison aux cellules Huh-7 (Lindenbach et al, 2005). Cette production est améliorée en utilisant la lignée Huh-7.5.1 dérivée de la lignée Huh-7.5 (Zhong et al, 2005).

Une autre approche utilisée a été l'intégration de l'ADNc du JFH-1 dans le génome de cellules Huh-7 pour produire le HCV de manière constitutive les particules virales (Cai et al, 2005).

Enfin, d'autres groupes ont réussi à améliorer le titre viral en réalisant des infections successives sur des cellules Huh-7 naïves, grâce au surnageant prélevé à partir des cultures de cellules transfectées, puis infectées (Delgrange et al, 2007; Zhong et al, 2005). Cette méthode permet de sélectionner, amplifier et stabiliser des mutations d'adaptation du virus à la culture cellulaire. Par la suite, la réintroduction des mutations d'adaptation dans le génome viral parental a permis d'augmenter de façon significative l'infectiosité de HCV (Delgrange et al, 2007).

c) Chimères intergénomiques et HCVcc

L'isolat JFH1 de génotype 2a a été la première souche virale capable de se propager en culture cellulaire. Depuis, l'ARN de génotype 1a et 1b se sont révélés être également infectieux en culture cellulaire (Pietschmann et al, 2009; Yi et al, 2006). Malgré de nombreux efforts, les titres infectieux de ces virus HCV restent très modestes. Ainsi, pour mieux étudier les génotypes du HCV, différents groupes ont alors entrepris la construction de chimères intra ou intergénomiques de HCV pour surmonter cette limitation au génotype 2a. Ce type d'approche était envisageable car des recombinants intergénomiques avaient été identifiés au sein de patients chroniquement infectés par HCV (Bhattacharya et al, 2011; Kalinina et al, 2002; Morel et al, 2010). Il a été suggéré que ce type de recombinaison survenait lors de la synthèse du brin négatif (Kalinina et al, 2004).

Le premier virus chimérique, de génotype 2, fut mis au point par le groupe de Lindenbach. Il a été construit en substituant seulement la région codant les protéines de capsid à NS2 de la souche JFH1 par celle de J6, tout deux de génotype 2 (Lindenbach et al, 2005). Cette chimère se réplique correctement et produit des virus infectieux à des titres plus

élevés que le JFH-1. Les virus chimériques produits *in vitro* à partir de cette construction infectent également le chimpanzé et la souris humanisée (Lindenbach et al, 2006).

Différentes chimères intergénomiques ont alors été construites en gardant le pouvoir répliatif du JFH1 mais en substituant la région des protéines de structure jusqu'à NS2 (Gottwein et al, 2007; Gottwein et al, 2009; Jensen et al, 2008; Kato et al, 2007; Koutsoudakis et al, 2006; Pietschmann et al, 2006; Pietschmann et al, 2009; Scheel et al, 2008; Yi et al, 2007).

Cependant, la propagation de certaines d'entre-elles nécessite souvent une adaptation en culture cellulaire, ce qui suggère la sélection de mutations plus adaptées pour ces chimères. C'est le cas pour la chimère 1a/JFH-1 (souche H77 et JFH-1), pour laquelle la mutation de la Glutamine en position 1251 vers une Leucine (Q1251L, située dans la protéine NS3) améliore de manière significative l'infectiosité de cette chimère (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007). Par la suite, d'autres études ont montré que des mutations d'adaptation, situées à différentes positions des génomes recombinants, étaient importantes pour l'adaptation et la propagation de chimères intergénomiques construites à partir de différents génotypes (Gottwein et al, 2009; Ma et al, 2008; Scheel et al, 2011; Yi et al, 2007). Certaines de ces chimères intergénomiques infectent et se propagent au sein des modèles animaux du chimpanzé et de la souris, comme c'était le cas pour la chimère intragénomique J6/JFH-1 (Bukh et al, 2010; Pietschmann et al, 2009).

La mise au point des recombinants de HCV est une avancée importante. Ce type d'outils permet en effet d'étudier le comportement des particules virales issues de différents génotypes face à différentes molécules antivirales, ou bien encore d'étudier leur réactivité vis à vis des anticorps neutralisants. Cependant, la production virale pour ces chimères intergénomiques demeure encore pour le moment modérée (Meuleman et al, 2011).

d) Particularités de la souche JFH-1

La souche JFH-1 est apparentée au génotype 2a. Cependant les séquences de certaines parties de son génome dérivent par rapport aux séquences associées aux autres souches de génotype 2a, notamment les régions non-codantes en 5' et 3', ainsi que les séquences codant les protéines core, NS2 et NS5A (Kato et al, 2001). Jusqu'à présent, seule la souche JFH-1 se propage efficacement en culture cellulaire. Comme expliqué précédemment, différentes stratégies permettent de propager des particules virales apparentées à d'autres génotypes dans le système HCVcc., la condition étant de conserver le complexe répliatif NS3-5B du JFH-1,

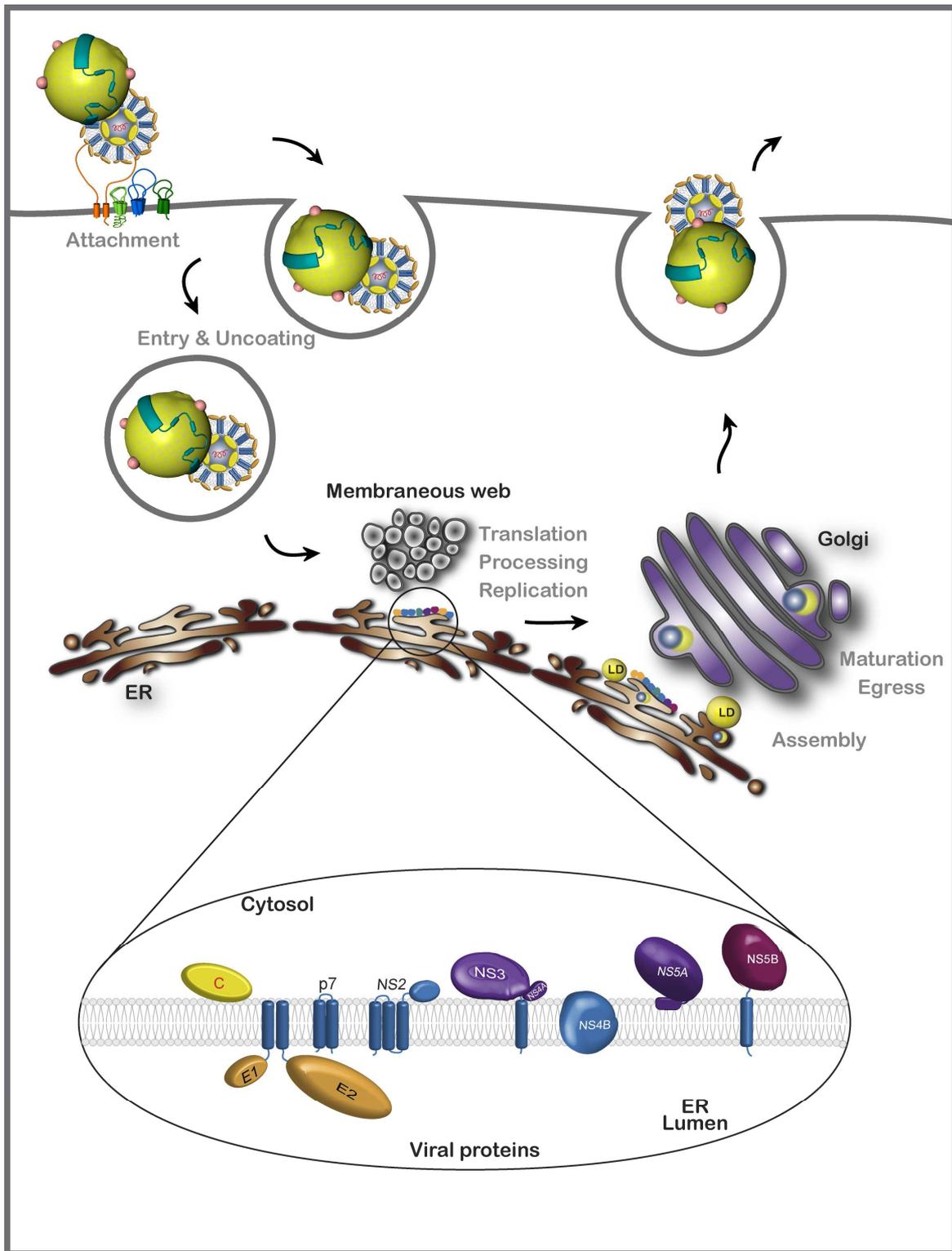
ou au moins la protéine NS3, ainsi que la région allant de NS5B jusqu'à la fin du génome HCV (Murayama et al, 2007).

Des études récentes montrent que la particularité du JFH-1 réside en partie au niveau de sa polymérase, NS5B (Schmitt et al, 2011; Simister et al, 2009). En effet, la structure de la polymérase de cette souche est moins lâche que ses homologues. Ceci est dû à la présence de certains résidus divergents à des endroits clés de la protéine, ayant pour effet de modifier légèrement la conformation spatiale de la protéine. NS5B gagne ainsi en stabilité sur les molécules d'ARN, permettant alors au complexe réplcatif du JFH-1 d'être bien plus efficace que ses homologues des autres souches, au moins dans le système HCVcc (Simister et al, 2009). Une étude a montré que la substitution des ces résidus clés au sein de la protéine NS5B de la souche J6 permettait d'obtenir une réplication aussi bonne voire meilleure que celle de la protéine NS5B du JFH-1 (Schmitt et al, 2011).

V. Le cycle viral

Le virus de l'Hépatite C possède un tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques. Son cycle viral, tel qu'il est envisagé à l'heure actuelle, repose essentiellement sur des analogies faites avec les virus de la même famille, ainsi que sur les observations réalisées grâce aux différents modèles élaborés ces dernières années.

La première étape, lors de l'infection par le HCV, est un attachement du virus à la surface des cellules cibles. Le HCV interagit avec divers facteurs d'entrée avant son internalisation par un processus d'endocytose dépendant de la clathrine (Blanchard et al, 2006). La fusion de l'enveloppe de la particule virale avec la membrane de l'endosome permet ensuite la décapsidation et la libération du génome viral dans le cytoplasme. Le génome HCV étant porté par un ARN de polarité positive, il sera ainsi directement traduit par la machinerie cellulaire et les protéines virales qui en résulteront participeront à la réplication du génome viral et à l'assemblage des particules. Puis, après encapsidation du matériel génétique, les nouvelles particules infectieuses seront relarguées par la cellule hôte (Figure 23).



(D'après (Tews et al, 2010))

Figure 23 : Représentation schématique du cycle viral de HCV

Dans un premier temps le virus se lie à la surface de la cellule cible grâce à son interaction avec ses divers facteurs d'attachement et d'entrée. Le virion est ensuite internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Une fois dans la cellule, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane endosomale ce qui amène à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. L'ARN de HCV sert alors à la synthèse des protéines virales au niveau du RE. Cet ARN est aussi utilisé comme matrice pour la réplication du génome viral, en passant par un intermédiaire brin négatif. Les protéines structurales servent ensuite à l'assemblage de nouvelles particules virales. L'assemblage et l'encapsidation sont associés aux gouttelettes lipidiques. Enfin les virions sont sécrétés en dehors de la cellule.

A. Attachement et entrée dans les hépatocytes

La première étape lors de l'infection par le HCV est la reconnaissance de différents facteurs d'entrée qui déterminent la cellule cible dans laquelle le virus se propagera. Au fil des études menées sur HCV, il a été montré que l'entrée du virus dans la cellule s'effectue d'abord par une interaction avec des facteurs d'attachement tels que les lectines, les glycosaminoglycanes ou les récepteurs aux LDL puis par une reconnaissance des différents récepteurs spécifiques du HCV, caractérisant ainsi son tropisme (Figure 24).

Jusqu'à présent, quatre récepteurs cellulaires ont été décrits comme impliqués dans le processus d'entrée de HCV : CD81, SRBI, Claudine et Occludine.

1. Facteurs d'attachement

a) Les lectines

Les lectines DC-SIGN et L-SIGN sont situés soit à la surface des cellules dendritiques et des macrophages pour la première, soit à la surface des cellules de l'endothélium bordant les capillaires sinusoides du foie pour les secondes. Cependant il a été montré que des interactions spécifiques existaient entre ces lectines et la protéine E2, sous forme recombinante, au sein de HCVpp, ou bien encore avec des particules provenant de sera de patients (Gardner et al, 2003; Lozach et al, 2004; Lozach et al, 2003).

Ces lectines contribuent non seulement, en tant que facteur d'attachement, à capturer et à concentrer le HCV dans le foie, mais elles jouent également un rôle dans l'infection des cellules T du système immunitaire.

b) Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes, présents à la surface des cellules, représentent souvent un premier site de fixation pour beaucoup de virus, parmi lesquels on retrouve de nombreux membres de la famille des *Flaviviridae* (pour revue (Spillmann, 2001)). Plusieurs travaux utilisant les différents systèmes d'étude de HCV montrent que l'héparine, un homologue des héparanes sulfates, et l'héparinase, capable de dégrader les héparanes sulfates présents à la surface des cellules, inhibent l'adsorption de HCV (Barth et al, 2003; Barth et al, 2006; Basu et al, 2007; Morikawa et al, 2007). D'autres glycosaminoglycanes ne semblent pas, par contre, avoir d'effet inhibiteur.

L'interaction entre les particules virales et les glycosaminoglycanes n'est pas clairement établie. Toutefois les glycoprotéines d'enveloppe de HCV associées aux particules

virales infectieuses, secrétées ou présentes au sein des cellules infectées, interagissent avec l'héparine (Vieyres et al, 2010). De plus la conservation dans la région HVR1 de résidus chargés positivement laisse à penser que cette zone interagirait avec les glycosaminoglycanes, qui sont des molécules chargées négativement (Penin et al, 2001). Une autre hypothèse concernant l'interaction entre HCV et les glycosaminoglycanes serait que celle-ci se déroule de manière indirecte par l'intermédiaire d'une autre protéine.

c) Le récepteur LDL

Les particules virales de HCV sont associées aux LDL et VLDL dans le sérum des patients (Andre et al, 2002). Ainsi, le récepteur aux LDL a été suggéré comme facteur d'attachement de HCV (Lavillette et al, 2005b). En effet, il a été montré que l'infection par HCV provenant de sera de patients infectés pouvait être inhibée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre : les LDL, les VLDL, le récepteur aux LDL, ou bien encore les apolipoprotéines B ou E (Agnello et al, 1999; Molina et al, 2007). Par la suite, il a été montré qu'il existait une corrélation entre l'accumulation d'ARN viral dans les hépatocytes primaires, l'expression du LDL-R et l'entrée des LDL (Molina et al, 2007). Enfin, il a été suggéré que l'interaction de E2 avec les lipoprotéines augmenterait l'affinité de HCV pour le LDL-R (Wunschmann et al, 2006).

2. Facteurs d'entrée

a) Le récepteur CD81

L'utilisation de la forme soluble de E2 a permis d'identifier CD81 comme l'un des facteurs d'entrée de HCV (Pileri et al, 1998). Le rôle de ce récepteur dans le processus d'entrée de HCV été confirmé par l'utilisation des outils HCVpp et HCVcc.

Tout d'abord, il a été montré que l'utilisation d'anticorps anti-CD81 ou de formes solubles de la large boucle extracellulaire de CD81 inhibent l'entrée des HCVpp (Bartosch et al, 2003c; Cormier et al, 2004; Hsu et al, 2003; Kapadia et al, 2007) ou des HCVcc (Kapadia et al, 2007; Lindenbach et al, 2005; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005). L'entrée du virus dans la cellule est également perturbée si l'expression de CD81 est réduite par des ARN interférents (Koutsoudakis et al, 2007; Zhang et al, 2004a). Par ailleurs, des expériences menées sur des souris humanisées révèlent que les anticorps anti-CD81 protègent de l'infection par HCV *in vivo* (Meuleman et al, 2008). De plus, l'expression ectopique de CD81 dans les cellules HepG2, résistantes à l'infection par HCV, restaure l'infectiosité du HCV

dans ces cellules et constitue une autre preuve de l'importance de CD81 pour l'entrée du virus (Cormier et al, 2004; Lindenbach et al, 2005). Enfin, il a été montré que CD81 intervient après l'attachement de HCV sur ses cellules cibles (Koutsoudakis et al, 2006). Toutes ces informations soulignent ici le rôle majeur que joue CD81 dans le processus d'entrée de HCV au sein des cellules hépatiques.

CD81 appartient à la famille des tétraspanines, protéines connues pour s'organiser en réseau et posséder des protéines partenaires. L'un des partenaires connu de CD81 est la protéine EWI-2. Une étude a montré qu'une forme clivée d'EWI-2, appelée EWI-2wint (pour EWI-2 without its N-Terminus), bloque l'entrée de HCV dans les cellules (Rocha-Perugini et al, 2008). La forme EWI-2wint est présente dans de nombreuses lignées cellulaires, mais EWI-2 n'est exprimée dans les hépatocytes que sous sa forme complète. Cette étude est la première qui montre que l'absence d'un facteur négatif est importante pour le processus d'entrée de HCV.

b) Le récepteur SR-BI

Le récepteur scavenger de classe B et de type I (ou SR-BI) a été identifié comme un facteur d'entrée potentiel de HCV grâce à l'utilisation de formes solubles de la protéine E2 (Scarselli et al, 2002). Ensuite, les HCVpp et HCVcc ont permis de démontrer le rôle de ce récepteur dans l'étape d'entrée de HCV dans les cellules.

L'utilisation d'anticorps anti-SR-BI, tout comme la réduction de l'expression de ce récepteur par des siRNA, permet d'inhiber l'infection par le HCV, ce qui souligne son implication dans le processus d'entrée du virus (Bartosch et al, 2003c; Kapadia et al, 2007; Lavillette et al, 2005b; Zeisel et al, 2007). De plus, il est possible de rendre des cellules d'hépatome de rat, ou des cellules épithéliales humaines, sensibles à l'infection par des HCVpp, au moyen de l'expression ectopique de SR-BI au sein de ces cellules (Dreux et al, 2009).

SR-BI est un récepteur impliqué dans le transfert du contenu lipidique des différentes lipoprotéines au sein des cellules. Même si le rôle exact de SR-BI dans l'entrée de HCV n'a pas été complètement élucidé à ce jour, il a été montré d'une part que la présence de HDL facilite l'entrée de HCV dans ses cellules cibles via un mécanisme dépendant de SR-BI (Dreux et al, 2006; Voisset et al, 2005). D'autre part, des études ont souligné que ce récepteur intervient après l'attachement des particules virales à la cellule, et avant que HCV n'interagisse avec CD81 (Zeisel et al, 2007).

c) La protéine de jonction serrée Claudine

Partant du constat que les récepteurs SR-BI et CD81 sont nécessaires mais pas suffisants pour l'entrée de HCV dans ses cellules cibles, la question a été soulevée de la participation d'autres facteurs à ce processus d'entrée. La protéine des jonctions serrées Claudine-1 (CLDN-1) fut alors identifiée comme cofacteur nécessaire à l'entrée de HCV, et ce par l'expression d'une banque d'ADNc constituée à partir de cellule hépatique humaine (Evans et al, 2007). Ainsi, l'expression de la CLDN-1 dans les cellules HEK 293T, cellules réfractaires à l'infection par le VHC, bien que possédant les récepteurs SR-B1 et CD81, restaurent l'infectiosité des HCVpp et HCVcc (Evans et al, 2007). De plus, le fait de réduire l'expression de cette protéine dans les cellules Huh7.5 peut amener à inhiber l'infection de ces cellules (Evans et al, 2007). Finalement, l'utilisation d'anticorps dirigés contre CLDN-1 permet également de bloquer l'infection par HCV (Krieger et al, 2010).

La protéine CLDN-1 appartient à une famille de 24 composés impliqués dans la formation des jonctions serrées et d'autres membres de cette famille sont capables de rendre les cellules HEK 293T permissives à l'infection. Il s'agit des CLDN 6 et 9 (Meertens et al, 2008; Zheng et al, 2007). Néanmoins, ces protéines ne sont pas exprimées par les lignées hépatocytaires sensibles à l'infection par HCV. On les retrouve par contre dans les cellules mononucléées du sang (Zheng et al, 2007).

CLDN-1 est principalement localisée au niveau des contacts cellule-cellule. Elle se situe, s'agissant des hépatocytes polarisés, principalement au niveau des jonctions serrées (Yang et al, 2008). Certaines études indiquent qu'il existe des interactions CD81/CLDN-1 pouvant amener à la formation de complexes entre ces deux protéines et jouant un rôle dans le processus d'entrée de HCV (Harris et al, 2010; Harris et al, 2008). D'autres travaux ont montré qu'une fois que l'association entre les glycoprotéines d'enveloppe et CD81 est effectuée, le complexe CD81/virus subit une migration vers les jonctions serrées avec CLDN-1 (Brazzoli et al, 2008). Ces observations suggèrent que CLDN-1 est impliquée tardivement dans le processus d'entrée de HCV. Enfin, ce corécepteur aurait aussi un rôle important dans le processus de transmission de cellule à cellule de HCV (Timpe et al, 2008).

d) La protéine de jonction serrée Occludine

Un quatrième facteur d'entrée pour HCV a été récemment identifié. L'expression d'une banque d'ADNc dans des cellules murines a permis d'identifier ce facteur : il s'agit de l'Occludine (OCLN), une protéine des jonctions serrées (Ploss et al, 2009). Ce récepteur

interagit avec la glycoprotéine virale E2 et la diminution de son expression par des siRNAs inhibent l'infection par HCV (Liu et al, 2009). Comme CLDN-1, OCLN est une protéine des jonctions serrées ; elle interviendrait donc à une étape tardive du processus d'entrée de HCV (Benedicto et al, 2009), probablement lorsque les complexes virus/récepteurs se regroupent au niveau de ces jonctions. Cette protéine pourrait également jouer un rôle majeur dans la transmission du virus par contact cellule-cellule (Ciesek et al, 2011).

L'Occludine est une protéine très exprimée dans les cellules hépatiques. Elle existe sous différentes formes, mais seules les OCLN possédant le domaine protéique MARVEL permettent l'infection par HCV (Kohaar et al, 2010). Des études menées sur l'entrée de HCV dans des cellules humaines et murines indiquent que SR-BI et CLDN-1, que leur origine soit murine ou humaine, permettent l'infection, alors que seules les formes humaines de CD81 et OCLN sont nécessaires pour le processus d'entrée du HCV (Ploss et al, 2009). Cependant, la mutation de deux résidus de l'OCLN murine vers ceux de l'OCLN humaine, permet de restaurer l'infectiosité du HCV (Ciesek et al, 2011). Ainsi OCLN contribue à la spécificité d'espèce et au tropisme du HCV.

3. Internalisation des particules virales

Lorsque les particules virales se sont attachées à la cellule puis qu'elles se sont fixées sur leurs facteurs d'entrée, les complexes virus/récepteurs sont dirigés vers les protéines des jonctions serrées. CLDN-1 et OCLN interviennent alors pour faciliter l'internalisation des particules virales (Benedicto et al, 2009; Brazzoli et al, 2008) (Figure 23 et Figure 24). Celle-ci se déroule ensuite en suivant la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard et al, 2006; Meertens et al, 2006). Ceci fut suggéré à travers plusieurs observations de dépendance au pH de l'entrée des HCVcc et HCVpp, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes (Bartosch et al, 2003c; Blanchard et al, 2006; Hsu et al, 2003; Koutsoudakis et al, 2006; Meertens et al, 2006) ou de l'utilisation de siRNA dirigés contre la clathrine et inhibant l'entrée de HCV dans ses cellules cibles (Blanchard et al, 2006; Meertens et al, 2006).

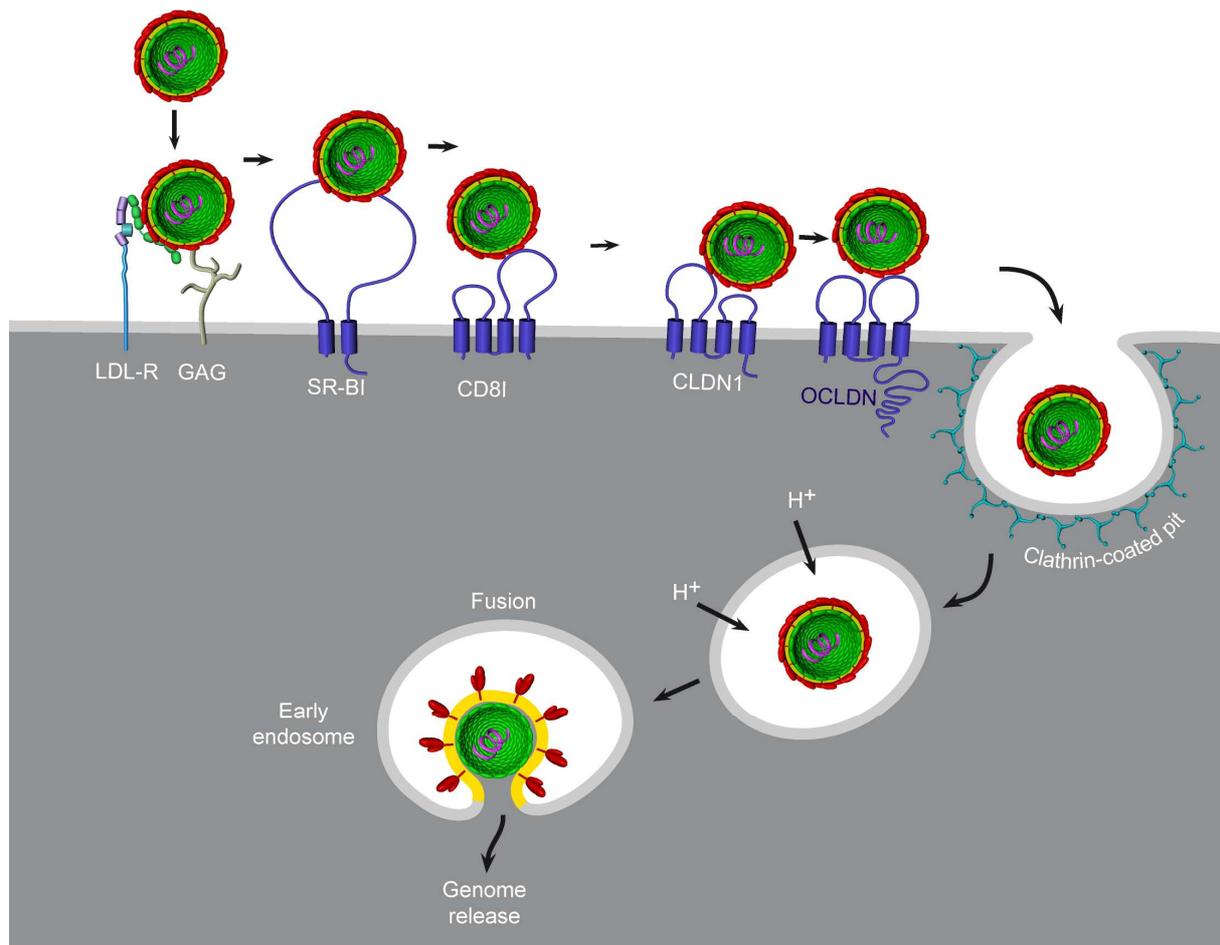


Figure 24 : Représentation schématique de l'entrée de HCV dans ses cellules cibles

L'attachement des particules virales à la cellule est facilité par l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les glycosaminoglycanes (GAGs) et le LDL-R. Une fois les virions attachés, le processus d'entrée se déroule de manière séquentielle, la particule interagissant tour à tour avec les récepteurs SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLDN. La particule virale est alors internalisée via un processus d'endocytose dépendant de la clathrine. Enfin l'enveloppe virale fusionne avec la membrane des endosomes, après leur acidification, et libère ainsi le génome viral dans le cytoplasme.

4. La fusion

Une fois que les particules virales sont internalisées, le virus fusionne avec la membrane de l'endosome pour libérer son génome dans le cytoplasme de la cellule. Cette fusion a lieu dans les endosomes précoces (Koutsoudakis et al, 2006; Meertens et al, 2006) et dépend du pH de ces mêmes endosomes (Figure 24). De nombreux virus enveloppés sont sensibles au changement de pH et sont inactivés par un traitement acide. Ce n'est pas le cas pour le HCV. Cela suggère que des événements intervenant entre l'attachement et l'acidification des endosomes précoces incitent les particules virales à adopter une conformation spatiale les rendant sensibles au pH (Meertens et al, 2006; Tscherne et al, 2006). Le seuil minimum observé pour la fusion avec les endosomes est à un pH de 6,3. Un optimum à pH 5.5 est atteint lorsque le processus de fusion concerne les liposomes ou les HCVpp (Haid et al, 2009; Lavillette et al, 2006). En ce qui concerne les HCVcc, et dans les

expériences de transmission de virus de cellule à cellule, l'optimum est atteint pour des pH de 5 et moins (Haid et al, 2009; Kobayashi et al, 2006; Lavillette et al, 2006) (Figure 23 et Figure 24).

Différents facteurs interviennent également pour moduler cette étape du cycle viral. Ainsi, le processus de fusion est dépendant de la température. Ceci est observé grâce à des tests de fusion réalisés entre des HCVpp ou des HCVcc et des liposomes. A 4°C aucune fusion n'est observée. De plus, dans ces tests, la présence de récepteurs ou de protéines à la surface des liposomes n'est pas nécessaire (Haid et al, 2009; Lavillette et al, 2006). Il est montré également que le cholestérol facilite la fusion (Haid et al, 2009). Les protéines d'enveloppe E1 et E2 prennent également une part active dans ce processus. Ainsi, la région de E1, correspondant aux aa 270 à 284, et deux régions de E2, correspondant aux aa 416 à 430 et 600 à 620) participent de ce mécanisme (Haid et al, 2009; Lavillette et al, 2007). De plus, certaines mutations au niveau des domaines transmembranaires de ces glycoprotéines peuvent perturber cette étape de fusion (Ciczora et al, 2007). Enfin, une étude suggère le rôle des microtubules dans l'étape d'entrée de HCV (Roohvand et al, 2009). Ceux-ci seraient impliqués dans l'acheminement des particules virales vers les sites de fusion, puis dans les événements suivant la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte.

B. La synthèse des protéines virales

1. Traduction du génome viral

Le génome de HCV est codé par un ARN simple brin de polarité positive. Il se comporte de manière analogue à un ARN de type messenger (ARNm) une fois qu'il est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN viral code un seul cadre ouvert de lecture flanqué de deux extrémités non-codantes, situées en 5' et 3'. Le génome viral est ensuite traduit directement par la machinerie cellulaire. La traduction est initiée grâce au site interne d'entrée des ribosomes (IRES), situé dans la région 5' non-codante de l'ARN viral (Tsukiyama-Kohara et al, 1992; Wang et al, 1993). La sous-unité 40S du ribosome se fixe ainsi au niveau du codon d'initiation AUG. Par la suite, le facteur d'initiation eIF3 l'ARNt initiateur ainsi que le facteur eIF2 et la GTP sont recrutés. La sous-unité 60S est finalement recrutée grâce à l'hydrolyse du GTP ; cette dernière étape de l'initiation conduit à la formation du complexe de traduction complet (Ji et al, 2004; Otto & Puglisi, 2004), permettant ainsi à la traduction de débuter. Il est à noter que la région 3' non-codante peut jouer un rôle régulateur au niveau de la traduction du génome viral (Murakami et al, 2001;

Song et al, 2006). Finalement, la synthèse et la maturation de différentes protéines virales sont en relation avec les membranes du RE.

2. Les protéines virales

Les protéines virales du HCV sont produites, au cours de l'expression du génome viral, par des clivages co- et post- traductionnels. Les protéines structurales sont produites suite à des clivages engendrés par des signal peptidases et des peptidases de peptide signal d'origine cellulaire. Ces clivages ont lieu entre les protéines C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 (Hijikata et al, 1991; McLauchlan et al, 2002). Deux protéases virales sont responsables quant à elles des clivages aboutissant à la production des protéines non structurales du HCV. Il s'agit de la protéase NS2, qui assure le clivage entre NS2 et NS3 et de la protéase NS3, qui associée à NS4A, assure les clivages entre les protéines NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4A/NS5A et NS5A/NS5B (Grakoui et al, 1993a; Grakoui et al, 1993b; Hijikata et al, 1993a) (Figure 11).

C. La réplication du génome viral

L'ARN génomique de HCV est utilisé comme matrice dans deux processus indispensables au bon déroulement du cycle viral : la réplication du génome et la synthèse des protéines virales. Le passage du premier de ces processus vers le second semble dépendre des régions non-codantes du génome de HCV, ainsi que de certains facteurs viraux et cellulaires. Les protéines non-structurales NS3 à NS5B constituent le complexe de réplication (Lohmann et al, 1999) qui est en étroite association avec les membranes cellulaires, comme c'est le cas pour de nombreux virus à ARN positif. Les sites de réplication de l'ARN de HCV ont été localisés au sein d'altérations des membranes cellulaires, organisées en réseau membranaire ou « membranous web » (Gosert et al, 2003) et dues à la protéine NS4B (Egger et al, 2002).

Le mécanisme complet de la réplication de HCV n'est pas encore complètement élucidé. Une chose est certaine, la réplication du HCV nécessite la synthèse d'une matrice d'ARN négatif, complémentaire du génome viral, servant ensuite de matrice pour produire de l'ARN positif. Cette production est effectuée par les intermédiaires de réplication, formés d'ARN double brins (Targett-Adams et al, 2008). Les brins d'ARN positif néoformés peuvent servir ensuite soit de matrice pour la production de nouvelles protéines virales, soit de matrice pour la production de nouveaux intermédiaires de réplication. A défaut, ils sont encapsidés dans les nouveaux virions produits.

L'initiation de la réplication dépend de l'interaction entre la région X de l'extrémité 3'UTR, indifféremment de la polarité du brin servant de matrice, des structures et séquences particulières du génome viral (Friebe et al, 2005), et des facteurs cellulaires de l'hôte. La région 5'UTR est également impliquée dans cette étape de la réplication (Friebe et al, 2001; Kim et al, 2002). Ce type d'interaction permettrait le recrutement des différentes protéines virales impliquées dans la formation du complexe de réplication.

Le rôle exact des différentes protéines virales impliquées dans le complexe de réplication n'est pas encore connu. Toutefois, les données actuelles ont permis de montrer que la protéine NS3 est capable de désenrouler les structures secondaires et de séparer les doubles brins d'ARN. La partie hélicase est adressée au niveau des membranes cellulaires par l'intermédiaire de son cofacteur NS4A qui module également son activité protéasique (Kuang et al, 2004; Pang et al, 2002; Wolk et al, 2000; Zhu & Briggs, 2011). Ces mêmes membranes cellulaires sont quant à elles réorganisées par la protéine NS4B en réseau membranaire (Egger et al, 2002). Le niveau de phosphorylation de la protéine NS5A permet ensuite de passer de la phase de réplication à la phase de traduction (Appel et al, 2005; Tellinghuisen et al, 2008a). Cette protéine est capable de lier l'ARN (Huang et al, 2005) et d'interagir avec NS5B, lui permettant ainsi de moduler directement l'activité de la réplicase et de contrôler le transport des ARN vers les différents sites d'intérêt pour le cycle viral (traduction, réplication et assemblage) (Appel et al, 2006; Shimakami et al, 2004). Enfin, la protéine NS5B porte l'activité réplicase du complexe de réplication et est responsable de la synthèse des nouveaux brins d'ARN viraux.

Différents facteurs cellulaires sont également connus à ce jour pour avoir une influence sur le complexe de réplication et moduler ainsi son activité, parmi lesquels :

- hVAP-A et hVAP-B (Evans et al, 2004; Hamamoto et al, 2005)
- Les cyclophylines (Chatterji et al, 2010; Kaul et al, 2009)
- La protéine kinase 2 (Kim et al, 2004)
- FKBP8 et Hsp90 (Okamoto et al, 2006)
- GBF-1 (Goueslain et al, 2010)

Ces différents facteurs cellulaires se sont tous révélés comme jouant un rôle important dans le processus de réplication.

D. L'assemblage et la sécrétion virale

Les étapes finales du cycle viral de HCV sont l'assemblage et la sécrétion des nouveaux virions. Ces deux étapes sont les moins bien décrites du cycle, du fait de l'absence,

pendant longtemps, d'un système d'étude en culture cellulaire. Elles ont commencé à être clarifiées depuis la mise au point du système HCVcc.

1. Premières étapes de l'assemblage

Les gouttelettes lipidiques (GLs) ont été décrites comme les sites privilégiés d'assemblage des particules virales HCV (Miyanari et al, 2007). Le processus d'assemblage nécessite d'ailleurs l'association entre la protéine de capsid et ces organelles. Cette protéine est acheminée vers les GLs après avoir été maturée par deux clivages successifs, nécessaires à cet adressage (Depla et al, 2010; McLauchlan et al, 2002; Santolini et al, 1994). La perturbation de l'association entre les GLs et la protéine de capsid entraîne une forte diminution voir une inhibition complète de la production de particules virales, ce qui souligne l'importance de cette interaction (Boulant et al, 2007; Depla et al, 2010; Shavinskaya et al, 2007).

Comme vu précédemment, l'ARN viral est synthétisé au sein du réseau membranaire, dans des structures liées au RE (Egger et al, 2002; Gosert et al, 2003). L'association de l'ARN génomique de HCV aux protéines de capsid est essentielle pour la formation de la nucléocapsid, et par extension pour la production de particules virales infectieuses. Ainsi, l'ARN doit être acheminé vers les protéines de capsid localisées au niveau des GLs. A l'heure actuelle deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer le mécanisme permettant cet acheminement de l'ARN vers les GLs. La première hypothèse suggère que les GLs pourraient être recrutés au niveau des complexes de répliquons GLs, par le biais d'interactions entre la protéine de capsid et les microtubules (Boulant et al, 2008). La seconde hypothèse suggère quant à elle que c'est le complexe de répliquon qui serait transporté vers les GLs via le réseau de microtubules, grâce cette fois à des interactions entre les protéines NS3 et NS5A avec la tubuline et l'actine (Lai et al, 2008). Dans les deux cas, il est important de souligner que la protéine NS5A joue un rôle essentiel dans l'initiation du processus d'assemblage (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008; Miyanari et al, 2007).

2. Rôle des protéines non-structurales dans l'assemblage

Les protéines non-structurales de HCV peuvent, elles aussi, jouer un rôle important dans le processus d'assemblage des particules virales (Figure 25). Ainsi, la protéine NS5A est essentielle à la mise en relation de la capsid avec l'ARN viral, mais également au recrutement du complexe de répliquon au niveau des GLs (Miyanari et al, 2007). Le domaine III de cette protéine possède des résidus sérines nécessaires à une bonne production

virale. Il a en effet été montré que la mutation ou la délétion de ces aa inhibe l'interaction de NS5A avec la capsidie et par extension l'interaction de l'ARN viral avec la capsidie (Masaki et al, 2008; Tellinghuisen et al, 2008a).

La protéine NS3 est également nécessaire à la formation de la nucléocapsidie. Une étude récente a en effet montré que la protéine de capsidie sous forme dimérisée est capable d'interagir avec NS3 au niveau des GLs (Mousseau et al, 2010). De plus, les études sur les chimères intergénomiques ont permis de montrer que la présence de mutations d'adaptation, au sein du premier domaine de la partie hélicase de NS3, est nécessaire à la production de particules virales infectieuses (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007).

Différents travaux montrent également que NS2 intervient dans la production de particules virales infectieuses et ce à une étape tardive de l'assemblage (Dentzer et al, 2009; Jirasko et al, 2008; Jones et al, 2007; Yi et al, 2009). La mutation ou la suppression de cette protéine n'empêche pas les protéines de capsidie, NS3 et NS5A de s'associer correctement avec les GLs ; toutefois, cela a pour effet d'empêcher la formation et la sécrétion de particules virales infectieuses (Yi et al, 2009). De plus, cette protéine est capable d'interagir aussi bien avec les protéines structurales qu'avec les protéines non-structurales et colocalise fortement avec les glycoprotéines E1 et E2. Ainsi, il est suggéré que NS2 jouerait un rôle clé dans la convergence des glycoprotéines et des particules virales naissantes pour former des virions infectieux (Ma et al, 2010; Popescu et al, 2011; Yi et al, 2009).

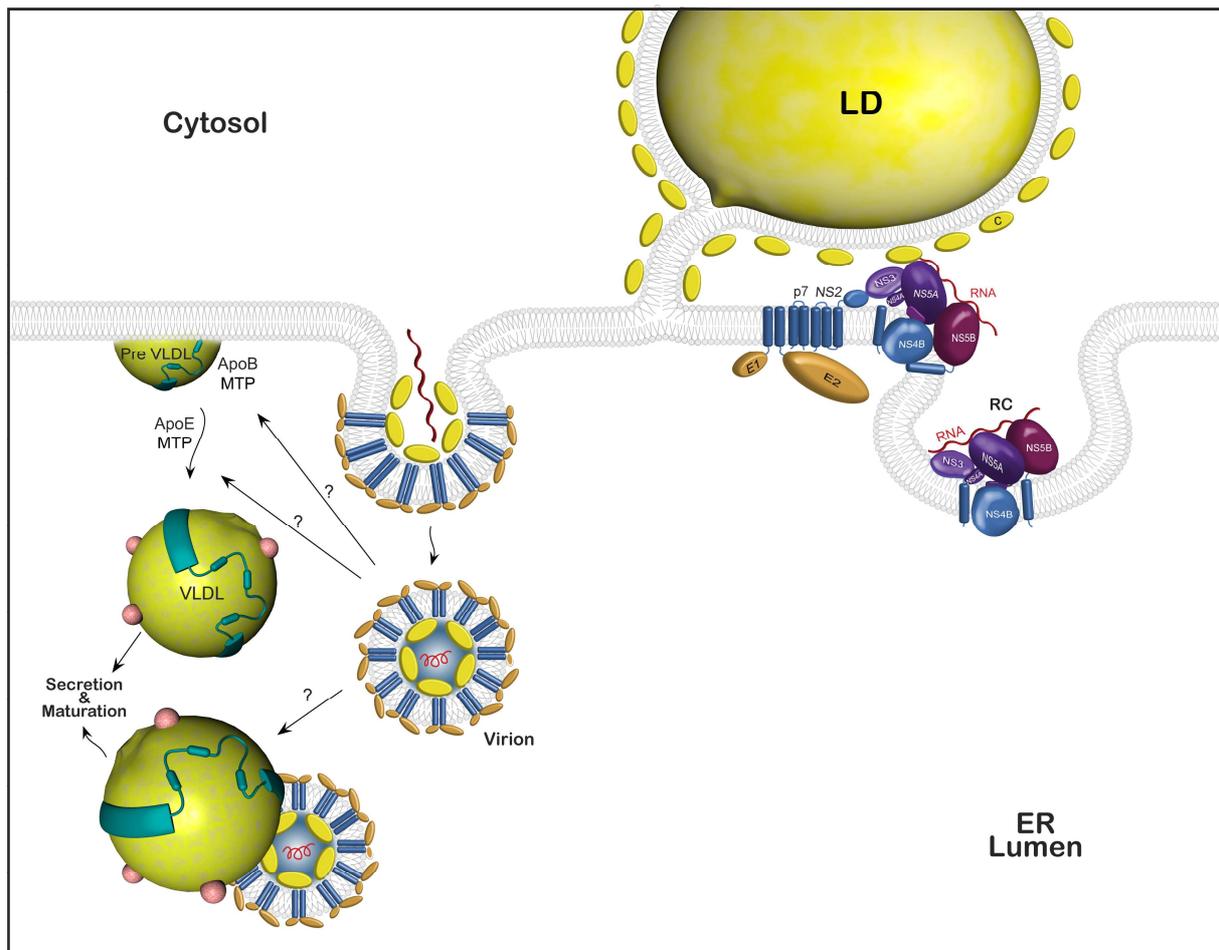
3. Rôle des lipides dans l'assemblage et la sécrétion

Il a été observé que les particules virales infectieuses extra-cellulaires ont une densité plus faible que les particules intracellulaires et que les virions peuvent former des lipo-viro-particules en s'associant avec les lipoprotéines (Andre et al, 2002; Gastaminza et al, 2006). Ces observations suggèrent l'existence d'un événement de maturation lié aux lipides. Comme les virus circulant sont associés à des VLDL riches en apolipoprotéine B et E (ApoB et ApoE), il a été suggéré que des mécanismes d'assemblage soient communs aux VLDL et à HCV (Andre et al, 2002; Chang et al, 2007; Gastaminza et al, 2006).

Les compartiments cellulaires liés à la réplication et à l'assemblage de HCV montrent la présence de l'ApoB, de l'ApoE et d'un des facteurs nécessaire à l'assemblage de ces apolipoprotéines : la protéine microsomale de transfert (ou MTP) (Gastaminza et al, 2008; Huang et al, 2007a). Plusieurs groupes ont essayé de déterminer l'effet de ces différents facteurs. Les données générées à ce jour présentent des résultats contradictoires quant à l'implication de la MTP, de l'ApoB (Gastaminza et al, 2008; Huang et al, 2007a) ou de

l'ApoE (Benga et al, 2010; Jiang & Luo, 2009) dans le processus d'assemblage. Cependant, il est certain que l'assemblage des VLDL joue un rôle important dans l'étape d'assemblage des virions de HCV (Figure 25).

Enfin, une étude récente a montré que des facteurs impliqués dans la formation et le trafic des endosomes, les protéines Vps4 et ESCRT, pourraient participer à la sécrétion des particules virales infectieuses de HCV (Corless et al, 2010).



(D'après (Tews et al, 2010))

Figure 25 : Modèle d'assemblage des particules virales de HCV

Les particules virales commencent à être assemblées dans le cytosol. La protéine de capsid (ici en jaune) s'accumule au niveau des GLs. Les complexes de réplication sont également recrutés au niveau des GLs via des interactions entre la protéine de capsid et les protéines non-structurales. Ceci amène à l'encapsidation de l'ARN génomique de HCV. Par la suite la nucléocapside néoformée bourgeonne au niveau de la membrane du RE, et peut ainsi acquérir son enveloppe virale (composé de la membrane du RE dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2). Enfin la maturation des particules virales se fait par leur association à la voie d'assemblage des VLDL.

C. Hépatocytes et filaments intermédiaires (IFs)

I. Le foie : organisation et fonction

Le foie, dont le poids représente près de 2% du poids d'un adulte, soit en moyenne 1,5 kilogramme, joue un rôle indispensable dans l'organisme par ses nombreuses fonctions vitales.

A. Organisation et anatomie du foie

Le foie possède une forme triangulaire et est constitué de deux lobes, le lobe droit et le lobe gauche, chacun étant séparé par le ligament suspenseur. Il est entouré par la capsule de Glisson, composée de tissus péritonéaux. Chaque lobe est subdivisé en une multitude de lobules hépatiques, séparés les uns des autres par du tissu connectif. Enfin, accolée au foie se trouve la vésicule biliaire. Il s'agit d'un petit organe capable de stocker et de concentrer les sécrétions de bile du foie, lorsque celles-ci ne sont pas exportées vers les intestins (pour revue (Ishibashi et al, 2009)).

Le foie est très irrigué par le sang d'où sa coloration rouge foncée. Sa vascularisation est tout à fait particulière. De fait, cet organe est d'une part alimenté par l'artère hépatique en sang oxygéné, nécessaire à son fonctionnement, et d'autre part, il est irrigué par la veine porte, pour réaliser différents traitements métaboliques sur le sang provenant du système digestif. Le sang provenant de deux origines différentes est finalement mélangé et réparti dans le système circulatoire par la veine sus-hépatique. Le foie est ainsi situé entre deux veines, chose assez rare dans l'anatomie des mammifères ; on parle ici de système porte (pour revue (Ishibashi et al, 2009)) (Figure 26).

Enfin, il est intéressant de noter qu'une des particularités du foie sain est sa capacité à s'auto régénérer rapidement. Cette caractéristique particulière permet notamment, dans le cadre des dons d'organes, de réaliser une transplantation de foie à partir d'un greffon prélevé chez un donneur vivant. Cette propriété est également exploitée lors de la mise au point de modèles animaux, que différentes équipes ont cherché à humaniser, dans un but de recherche scientifique.

B. Les cellules du foie

Les types cellulaires que l'on trouve au sein du foie se divisent en deux catégories : les cellules parenchymales (comme les hépatocytes) et les cellules non-parenchymales. Près de 78% des cellules composant le foie sont des hépatocytes. Le reste du volume de cet organe

représente pour 15,7% de l'espace extracellulaire, et pour approximativement 6,3% des cellules non-parenchymales (pour revue (Ishibashi et al, 2009)). Les cellules du foie sont organisées en travées autour d'un espace extracellulaire appelé sinusoïde. Les hépatocytes sont polarisés, leur pôle apical est dirigé vers les sinusoïdes, et est séparé des cellules endothéliales, qui sont elles directement à l'interface avec la lumière du sinusoïde, par l'espace de Disse. D'autres types de cellules sont localisés dans cet espace, comme les cellules de Kupffer ou les cellules de Ito.

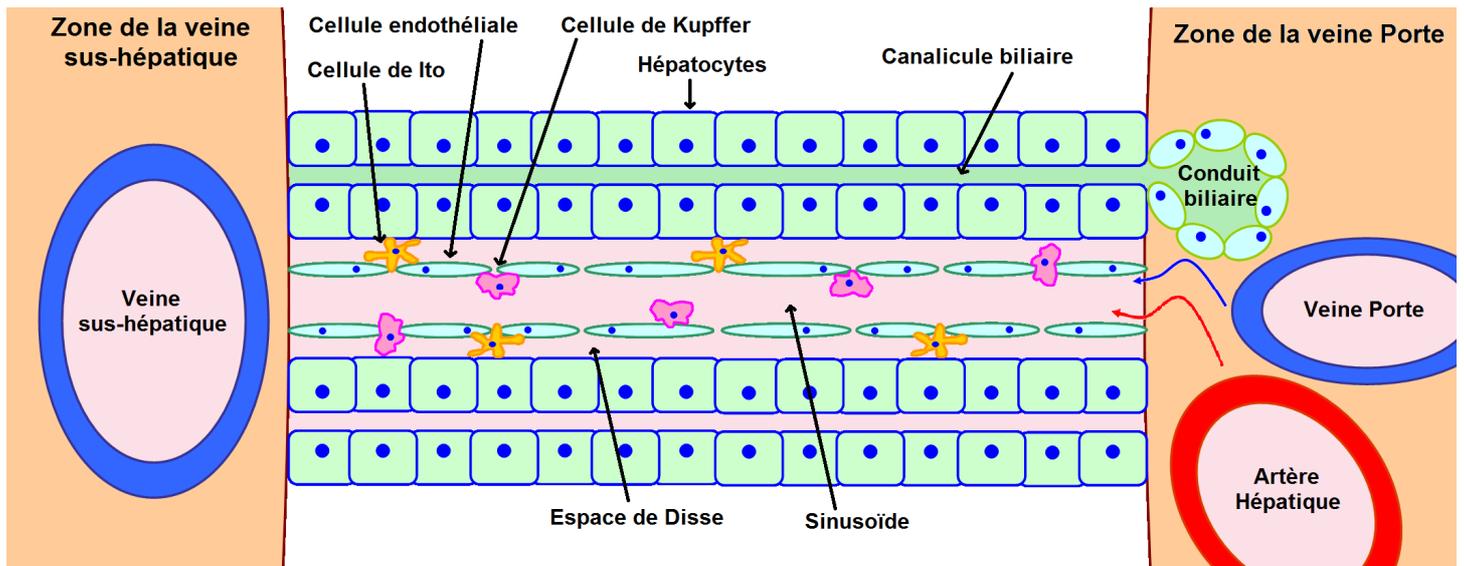


Figure 26 : Représentation schématique de l'organisation du foie

Le foie est un organe situé entre deux veines. D'un côté la veine porte, amenant le sang riche en nutriment du système digestif, et l'artère hépatique, chargée d'irriguer l'organe. Les cellules hépatiques sont organisées en travée autour d'espace extracellulaire appelé sinusoïde. Les hépatocytes sont séparés des sinusoides par l'espace de Disse, puis par une couche de cellules endothéliales. On retrouve les cellules de Ito, ainsi que les macrophages résident du foie : les cellules de Kupffer, dans l'espace de Disse et au niveau des sinusoides. Le sang provenant aussi bien de l'artère hépatique que de la veine porte passe par les sinusoides et voyage jusqu'à la veine sus-hépatique. Durant son passage dans les sinusoides du foie, le sang est en contact avec les hépatocytes et il subit ainsi différents traitements biochimiques.

A l'opposé du pôle apical des hépatocytes, dirigé vers les sinusoides, se trouve le pôle basal dirigé vers le canalicule biliaire, chargé de transporter les sécrétions de bile des hépatocytes, du foie vers la vésicule biliaire.

1. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont le type cellulaire majeur constituant le foie. Ce sont des cellules épithéliales qui s'organisent en plaque et forment les lobules hépatiques. Ces lobules constituent les unités structurales et fonctionnelles du foie. Les hépatocytes sont des cellules polarisées. Les protéines de jonctions serrées maintiennent cette polarisation et elles contrôlent les échanges entre chaque pôle. Le pôle basal de la cellule est vascularisé alors que le pôle apical est orienté vers les sinusoides, et séparé de ceux-ci par l'espace de Disse, puis par une couche de cellules endothéliales (pour revue (Ishibashi et al, 2009)).

Tous les hépatocytes semblent homogènes ; cependant il existe de légères différences fonctionnelles entre les cellules situées près de la veine porte et celles situées près de la veine hépatique centrale. Ceci permet d'assurer une modification progressive de la composition du sang traversant les sinusoides. L'ultrastructure de ces cellules reflète bien leur forte activité métabolique. Ces cellules possèdent un RE, ainsi que des membranes de l'appareil de Golgi, en abondance. On observe souvent en leur sein des granules de glycogène, des GLs et des lipoprotéines.

2. Les cellules non-parenchymales

Au sein du foie, les cellules non-parenchymales sont également appelées cellules hépatiques sinusoidales (Wisse et al, 1996). Ce groupe comporte plusieurs types de cellules, chacune remplissant une fonction spécifique au niveau des sinusoides.

Les cellules endothéliales, forment un véritable mur entre la lumière des sinusoides et l'espace de Disse. Cependant des échanges sont possibles entre ces deux compartiments. C'est ainsi que la lymphe peut être filtrée dans l'espace de Disse, ou que les solutés provenant du sang de la veine portale peuvent être échangés.

Les cellules de Küppfer sont les macrophages résidants dans le foie. Leur rôle principal est de nettoyer le sang circulant dans la lumière du sinusoides des impuretés et des micro-organismes ayant pu franchir la barrière gastro-intestinale. Ces cellules peuvent également produire des cytokines.

Les cellules hépatiques étoilées, encore appelées cellules de Ito, sont localisées dans l'espace de Disse. Elles possèdent un cytoplasme assez riche en GLs, et leurs principales fonctions sont de produire la matrice extracellulaire hépatique, les facteurs de croissance hépatique, et d'être responsable du stockage de la vitamine A.

Enfin le foie possède des cellules de l'épithélium biliaire, mais également des cellules liées au système immunitaire, comme des « natural killer » et des cellules dendritiques.

C. Les différentes fonctions du foie

Le rôle principal du foie est de fournir les quantités appropriées de solutés, nécessaires au bon fonctionnement de différents organes distants et par extension de l'organisme. Le foie possède ainsi plus de 500 fonctions et les hépatocytes sont capables de capturer, métaboliser, bio transformer et stocker une grande quantité et une grande variété de substances passant par lui. Ces substances sont amenées par la veine porte et proviennent en grande partie du système gastro-intestinal.

Le foie est capable d'oxyder les triglycérides pour produire de l'énergie et l'exporter vers d'autres organes. Il peut également convertir les excès de glucides et de protéines en lipides qui seront alors exportés et stockés dans les adipocytes. Le foie est aussi capable de synthétiser du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides dont certains de ces composés sont transportés à travers l'organisme au sein de lipoprotéines. Le reste est excrété dans la bile.

Cet organe joue en plus un rôle très important dans le métabolisme des glucides et il est responsable de près de 90% de la production totale de glucose et de l'homéostasie glucidique au sein d'un organisme.

Les hépatocytes peuvent synthétiser des aa non-essentiels, une bonne partie des protéines plasmatiques (comme l'albumine et certains facteurs de croissance). Ils possèdent en parallèle une activité catabolique, permettant la dégradation de peptides ou de protéines issues de la digestion.

Une des capacités du foie est de pouvoir détoxifier l'organisme, en éliminant certaines drogues ou toxines qui peuvent se retrouver dans la circulation sanguine. Enfin cet organe peut stocker du fer et des vitamines et réguler l'action de nombreuses hormones.

D. Pathologies associées au foie

Un foie endommagé se régénère, sauf si les dommages causés sont trop importants et qu'ils entraînent des dysfonctionnements. La gravité des atteintes hépatiques ne laisse parfois qu'une solution : la transplantation hépatique. Le dysfonctionnement du foie peut avoir des conséquences lourdes au niveau de l'organisme. Différentes pathologies sont à l'origine de son dysfonctionnement.

Chez les personnes diabétiques, obèses ou encore alcooliques chroniques, le foie peut évoluer vers un état de stéatose hépatique. Ce dysfonctionnement correspond à l'accumulation de graisse dans les hépatocytes et il est caractérisé par l'élévation anormale du taux de triglycérides dans cet organe. Si ce dernier n'arrive pas à se régénérer correctement, la stéatose peut conduire à des formes plus graves d'atteinte hépatique.

L'alcoolisme chronique est à l'origine de différentes pathologies du foie. Un des premiers stades de ces atteintes est l'hépatite alcoolique aigüe. Les symptômes observés sont généralement un teint jaunâtre (ictère), des douleurs dans la région hépatique, une augmentation du volume de l'organe (hépatomégalie), une fièvre modérée. Généralement, une biopsie hépatique est réalisée pour évaluer l'état du foie. Cette biopsie peut ainsi révéler des

états de stéatose, de cirrhose ou de fibrose, voire la présence de corps de Mallory-Denk (MDB).

L'infection par différents virus des hépatites peut également provoquer une inflammation du foie tendant à évoluer vers une hépatite aigüe, voire chronique. Il existe au moins cinq virus différents causant une hépatite virale, dénommés de A à E. Les hépatites virales ne sont pas identifiables par d'autres moyens que les tests sérologiques.

L'agression prolongée des cellules du foie peut conduire dans certains cas à la cirrhose hépatique, quelle que soit la cause des lésions touchant l'organe. Bien souvent, la cirrhose est l'évolution d'une hépatite aigüe ou chronique, qu'elle soit d'origine virale ou alcoolique. Elle induit une inflammation chronique à cause de la succession de cycles de nécrose/régénération des hépatocytes.

Les atteintes du foie résultant d'une hépatite chronique, d'origine alcoolique ou virale, peuvent amener au développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) qui se développera de manière localisée dans le foie avant d'envahir les vaisseaux portes et se métastaser.

II. Le cytosquelette

Le cytosquelette est l'acteur principal de l'architecture cellulaire. Il possède divers rôles essentiels à la vie de la cellule. Ainsi, il permet d'organiser l'intérieur de la cellule et de contrôler les différents phénomènes physiques liés à la vie de celle-ci (cycle cellulaire, processus de phagocytose, etc...). Il est également impliqué dans l'ancrage aux cellules voisines, la résistance aux diverses agressions physiques pouvant subvenir. Enfin, il orchestre le transport intracellulaire de divers composés via différents mécanismes (pour revue (Alberti, 2009)).

A. Composants du cytosquelette

Le cytosquelette possède trois types de structures différentes, il s'agit de structures protéiques constituées à partir de la polymérisation en tubules et filaments d'éléments monomériques. Il s'agit des microtubules, des filaments d'actines et des filaments intermédiaires.

1. Les microtubules

Les microtubules sont des constituants du cytosquelette produits et ancrés au niveau du MTOC (Microtubule Organizing Center) situé près du noyau. Ils se développent en général vers la membrane des cellules. Ils sont composés de l'association en dimère de molécules de

tubuline (α et β) qui s'associent grâce à l'hydrolyse de GTP. Les dimères s'assemblent pour former un tube possédant un diamètre d'environ 25 nm. Les deux extrémités sont capables de se développer, mais à un rythme différent. Ainsi, du côté négatif du microtubule (orienté vers le noyau), la vitesse observée sera beaucoup plus lente que du côté positif (orienté vers la membrane cellulaire). Les microtubules sont des structures capables de se désassembler facilement et certaines protéines cellulaires s'associent à ces structures pour les stabiliser, il s'agit des MAPs (Microtubule Associated Proteins). Enfin, il est à noter que plusieurs centaines de microtubules se forment en permanence depuis le noyau vers les membranes des cellules (Gardner et al, 2008; Howard & Hyman, 2003; Inoue & Salmon, 1995).

2. Les filaments d'actine

Les filaments d'actine sont d'autres constituants du cytosquelette. Ils résultent, cette fois, de la polymérisation de l'actine réalisée grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Diverses molécules interviennent sur les filaments d'actine en formation. Ces interactions permettent de réguler la constitution des filaments, de les stabiliser et même de les connecter entre eux. Ils possèdent un diamètre compris entre 5 et 9 nm et ils sont polarisés. Leur extrémité positive est orientée vers la membrane plasmique alors que leur extrémité négative pointe dans la direction des microtubules (Alberti, 2009). Comme pour les microtubules, leur vitesse de croissance est lente à l'extrémité négative, mais très rapide du côté du pôle positif.

3. Les filaments intermédiaires (IFs)

Les IFs sont des polymères très flexibles qui constituent le troisième type de structure composant le cytosquelette. Ils sont appelés « intermédiaires » car leur diamètre apparent de 10 nm est compris entre celui des microtubules et celui des filaments d'actine. Leur formation résulte de la polymérisation de différents constituants ; ces derniers varient en fonction du type cellulaire, parmi lesquels on trouve les kératines, la vimentine, les lamines et encore d'autres composants (Alberti, 2009). Les IFs possèdent de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Le chapitre suivant détaille de manière plus précise la composition, ainsi que le rôle de ces composants au sein de la cellule.

B. Fonctions et rôle du cytosquelette

Les différents composants du cytosquelette décrits précédemment s'organisent entre eux pour assurer de multiples fonctions au sein de la cellule.

Le cytosquelette possède un rôle avant tout structurel. Il permet de réguler la forme de la cellule grâce à la dynamique et aux interactions existant entre tous ses différents composants. Ceci permet aux cellules d'adopter une conformation particulière pouvant être liée à leur fonction, comme par exemple la forme étirée et allongée des cellules musculaires, les prolongements en neurofibrilles pour les neurones, ou encore les villosités des cellules épithéliales. Son association avec différentes protéines cellulaires lui permet également d'organiser le cytoplasme. Ainsi, il peut contrôler la structure interne grâce à son association aux différents organites et aux membranes nucléaires et plasmiques de la cellule. Dans certains cas, un ancrage aux cellules voisines est permis par l'association du cytosquelette à la membrane plasmique.

Le cytosquelette est également impliqué dans tous les mouvements que la cellule peut effectuer. Il est responsable de la migration des cellules adhérentes sur la matrice cellulaire, mais aussi des battements de cils dans les cellules épithéliales par exemple. Il intervient aussi au niveau de phénomènes remarquables comme la phagocytose.

En dehors de tous ces rôles entrant principalement en jeu au niveau de la structuration de la cellule, le cytosquelette possède également plusieurs fonctions impliquées dans le trafic et le transport intracellulaire. Ces phénomènes nécessitent l'utilisation de protéines dites « protéines cargos » qui assurent le processus de transport au sein de la cellule. Ces protéines varient en fonction du type de structure sur laquelle elles effectuent le transport mais également en fonction du sens selon lequel elles se déplacent (Ross et al, 2008; Snider et al, 2004). Ces mouvements sont aussi importants dans le signalling intracellulaire que dans la régulation des processus d'endocytose et d'exocytose (Howard & Hyman, 2003).

Enfin le cytosquelette, par l'intermédiaire de ces différents constituants, prend une part très importante dans le processus de mitose. Il permet la réorganisation interne de la cellule au cours de la mitose d'une part et il dirige la mise en place des deux cellules filles, en agissant au niveau de la séparation du matériel génétique et en permettant la contraction de l'anneau mitotique qui amène à la scission de la cellule mère en deux cellules filles d'autre part (Inoue & Salmon, 1995).

Les différentes fonctions décrites ici ne sont pas exhaustives, le cytosquelette possède de nombreuses autres fonctions dont certaines restent sans doute à découvrir.

III. Les filaments intermédiaires (IFs)

Les IFs sont un des types de composants essentiels à la formation et à la structuration du cytosquelette. Ils sont interconnectés aux deux autres types de structure cytosquelettique et

leur composition peut varier énormément d'un type cellulaire à l'autre. On dénombre plus de 70 gènes différents dans la superfamille des protéines de IFs (Szeverenyi et al, 2008).

A. Composition et formation des polymères précurseurs des IFs

1. Composition

Contrairement aux microtubules ou aux filaments d'actine qui sont formés à partir de protéines globulaires, les composants des IFs sont des protéines fibrillaires. Elles sont regroupées par homologie de séquences en 4 classes différentes auxquelles s'ajoute la classe V dans laquelle sont rassemblées les lamines nucléaires (Tableau 3) (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000; Oshima, 2007)). Récemment, une 6^{ème} classe a été créée pour les IFs qui composent le cytosquelette des cellules des yeux (Tableau 3) (Song et al, 2009).

Les classes I et II regroupent respectivement les cytokératines acides et basiques. C'est une des familles de protéines les plus importantes au sein de l'espèce humaine (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000; Oshima, 2007)). En dehors de la formation et du maintien du cytosquelette, certains de ces représentants interviennent dans la formation des produits cornés d'un organisme (cheveux, ongles, etc...). La classe III rassemble des protéines telles que la vimentine, la desmine, alors que les composants que l'on retrouve principalement au niveau des cellules nerveuses constituent la classe IV (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000; Oshima, 2007)). Enfin les principaux représentants de la classe VI sont la filensine et la phakinine qui interviennent au niveau de la formation du cytosquelette des cellules du cristallin (Song et al, 2009) (Tableau 3).

Du point de vue structurel, les différents composants des IFs adoptent la même organisation générale en trois parties (pour revue (Herrmann et al, 2009)). La partie centrale possède une forme de tige et elle a une conformation spatiale de type hélice α . Cette partie est entourée de deux domaines amino-terminaux n'adoptant pas de conformation en hélice α . Le domaine central possède de nombreux aa hydrophobes pouvant permettre leur association avec d'autres molécules du même type ((Parry et al, 2007) ; pour revue (Herrmann et al, 2009; Parry, 2005)).

Summary of IF-pathway categories and IFs not yet linked to a human disorder

IF protein type	Proteins	Primary cell/tissue	Diseases
Cytoplasmic			
I and II (including hair keratins)	K1–K28, K31–K40, and K71–K86	Epithelia and epidermal appendages	A broad range of skin and nail disorders (epidermal keratins), eye (ocular keratins), liver (simple epithelial keratins), and hair (hair keratins) disorders
I and II	K7, K15, K20, some hair keratins	Epithelia and epidermal appendages	?
III	Vimentin GFAP Desmin Syncoilin Peripherin	Mesenchymal cells and lens Astrocytes Muscle Muscle (mainly skeletal/cardiac) Peripheral nervous system	Cataract Alexander disease Cardiomyopathies ? ALS
IV	Neurofilaments α -Internexin Nestin Synemin	Central nervous system Central nervous system Neuroepithelial cells Muscle	ALS and CMT ? ? ?
Nuclear			
V	Lamins	Nuclear lamina	More than 12 laminopathies (lipodystrophy, muscular dystrophy, progeria, cardiomyopathy, restrictive dermatopathy, mandibuloacral dysplasia, CMT2B1, leukodystrophy).
Lens			
VI	Bfsp1 and Bfsp2	Fiber cells	Cataract

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; Bfsp, beaded filament structural protein; CMT, Charcot-Marie-Tooth.

(d'après (Omary, 2009))

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes classes de IFs

Ce tableau reprend les différentes classes de protéines constituant les IFs. La seconde colonne cite des exemples de protéines de ces classes, la troisième colonne indique dans quels types de cellules ou de tissus elles peuvent être retrouvées. Enfin la dernière colonne donne des exemples de maladies liées au dysfonctionnement de ces composants des IFs.

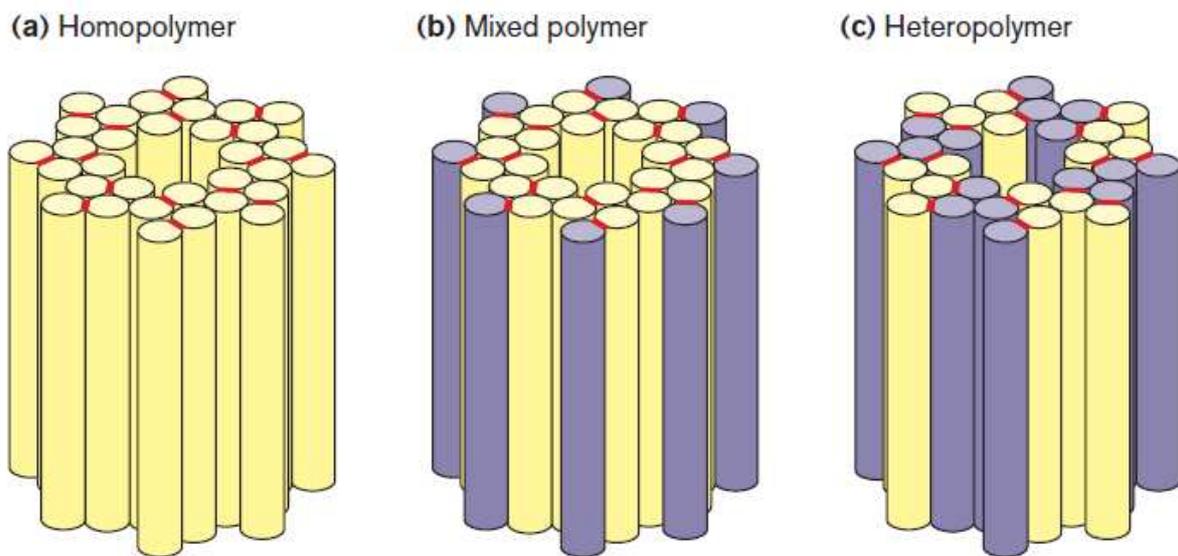
2. Formation des polymères

La classe de protéine de IFs exprimée va dépendre du type cellulaire. Les classes I et II sont toutes deux produites dans les cellules épithéliales. Elles regroupent respectivement les cytokératines acides et basiques. Il existe une particularité pour ces deux classes : chaque membre de l'une d'elle est capable de s'associer en hétérodimère (Figure 27) avec un représentant de l'autre classe (Hatzfeld & Weber, 1990; Steinert, 1990). Par contre ces cytokératines sont incapables de s'associer avec des membres des classes III, IV, V et VI. Les hétérodimères sont composés d'un rapport équimolaire entre cytokératine acide et cytokératine basique (Hatzfeld & Weber, 1990; Steinert, 1990).

Les classes III et IV sont exprimées dans les autres types de cellules, comme les cellules musculaires ou les neurones. Les représentants de ces classes s'assemblent en général en homodimère (Figure 27) avant de former les IFs (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000)).

Cependant il pu être montré que les protéines de neurofilaments de la classe IV (NF-L, NF-M et NF-H) s'associent en triplet, plus précisément une base de filament NF-L s'associe avec des hétérodimères NF-L/NF-M ou NF-L/NF-H, ce qui leur donne une meilleure stabilité par rapport à un filament formé d'homopolymère (Figure 27) (Brown et al, 1998). D'autres représentants de la classe IV peuvent interagir et former des IFs, avec des membres d'autres classes (Barry et al, 2007). La vimentine est quant à elle capable de s'associer à des protéines de la classe III et/ou de la classe IV. Enfin les lamines nucléaires ne peuvent s'assembler qu'avec des représentants de leur classe (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000)).

Au final trois types de polymères peuvent être distingués : 1- les homopolymères (Homopolymer) qui sont un assemblage d'une seule et même protéine, 2- les polymères composés d'un assemblage non équimolaire de différents composants (Mixed Polymer) et enfin, 3- les hétéropolymères (Heteropolymer) composés d'un rapport équimolaire entre deux protéines, comme c'est le cas pour l'assemblage des cytokératines (Figure 27).



(D'après (Herrmann & Aebi, 2000))

Figure 27 : Représentation schématique de l'organisation des différents polymères pouvant constituer les IFs.

(a) Représentation de l'organisation d'un homopolymère, cet arrangement peut être mis en place avec des protéines des classes III et IV. Un même type de protéine va d'abord s'organiser en dimère puis ceux-ci s'assemblent ensemble pour donner les IFs.

(b) Organisation de protéines des IFs en un assemblage non équimolaire. C'est par exemple le cas des neurofilaments, cet arrangement permet d'avoir une meilleure stabilité comparé aux homopolymères.

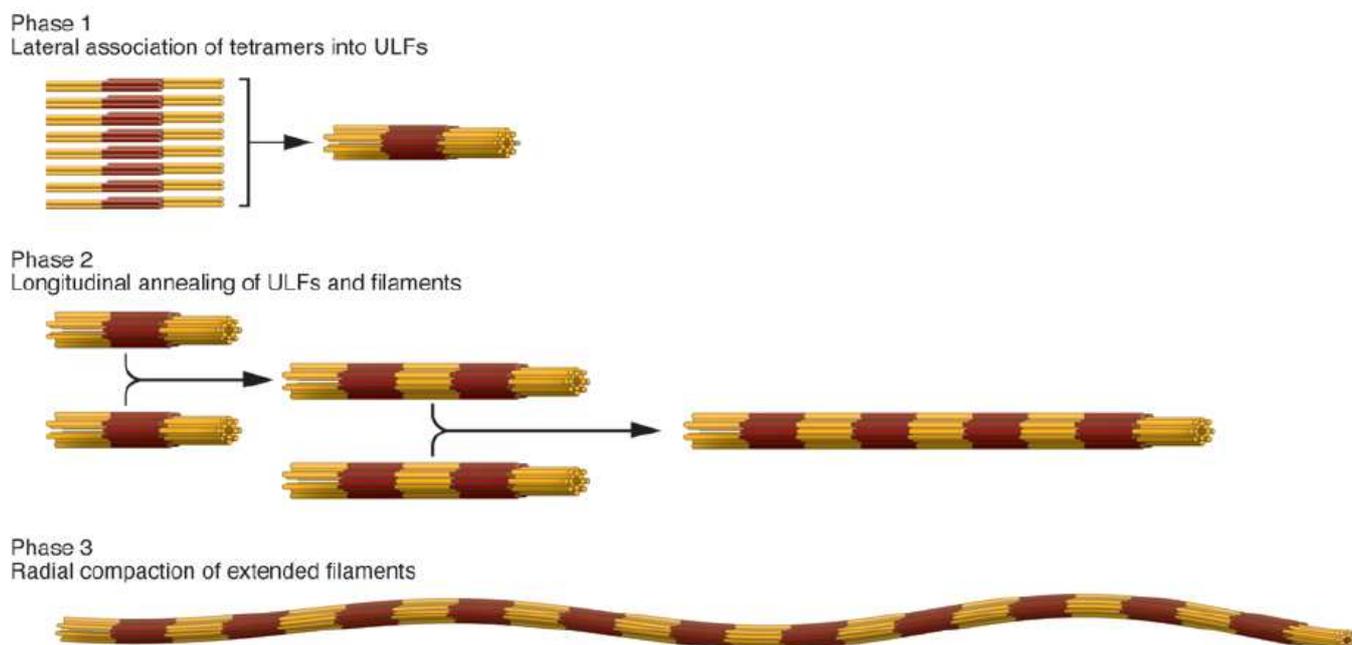
(c) Représentation schématique d'un hétéropolymère. Composé de deux protéines des IFs, présent en proportion équimolaire, cet arrangement est caractéristique des polymères de cytokératines. Les deux protéines vont d'abord s'associer en hétérodimère, avant que ces derniers ne s'assemblent entre eux pour former les IFs.

B. Assemblage et modifications des IFs

1. Assemblage des IFs

Il a été observé que l'assemblage des IFs se déroule de manière générale en trois grandes étapes. Une fois que des dimères sont formés avec les composants de base des IFs (Herrmann & Aebi, 1998), ceux-ci s'assemblent rapidement en tétramère, de manière latérale (Figure 28). Les tétramères se regroupent par huit, le plus souvent, pour donner des ULFs (Unit-Lenght Filaments) qui mesurent près de 16nm de diamètre et 58nm de longueur (pour revue (Herrmann & Aebi, 2000)).

Les ULFs s'associent ensuite entre-elles par leurs extrémités ce qui conduit à la formation de filaments de plusieurs centaines de nanomètres (Figure 28). C'est à ce moment que les filaments se compactent pour atteindre un diamètre compris entre 11 et 14nm, sans toutefois réduire leur masse par longueur (Kirmse et al, 2007). Les IFs sont ainsi formés. Il est à noter que les filaments immatures, souvent insuffisamment compactés, subissent une réorganisation interne jusqu'à être correctement compacté (Herrmann et al, 1999).



(D'après (Herrmann et al, 2009))

Figure 28 : Représentation schématique des trois phases d'assemblage des IFs.

Durant la première phase les protéines associées en dimère, puis en tétramère s'assemblent latéralement par groupe de huit tétramères, et donne les ULFs (Unit-Lenght-Filament).

Pendant la seconde phase de l'assemblage des IFs, les ULFs se lient les uns aux autres par leurs extrémités et atteignent la longueur final du IF en cours d'assemblage.

Finalement la phase 3 consiste en une compression radiale pour que le diamètre du IF néoformé atteigne environ 11nm.

Une fois que les IFs sont assemblés, des protéines cellulaires interagissent avec ces structures (Fuchs & Cleveland, 1998; Ku et al, 1999). Une partie de ces protéines associées aux IFs (IFAPs), comme par exemple la plectine, leur permet de se connecter aux autres éléments du cytosquelette (à savoir les filaments d'actine ou les microtubules) (Svitkina et al, 1996). Ces connexions sont indispensables pour la mise en place du cytosquelette et le maintien d'une bonne dynamique cellulaire. D'autres IFAPs permettent de mettre en relation les IFs avec les protéines de jonction, et jouent ainsi un rôle ultra-structural important. C'est le cas de certains membres de la famille des plakines, par exemple la desmoplakine qui permet une connexion avec les desmosomes (Smith & Fuchs, 1998). Enfin, les protéines de choc thermique (HSP) sont également associées aux IFs et elles interviennent au niveau de la gestion des différents stress que la cellule peut subir (pour revue (Toivola et al, 2010)).

2. Modifications post-traductionnelles des IFs

Les IFs et leurs composants peuvent subir diverses modifications post-traductionnelles produisant ainsi des effets de régulations du cytosquelette et pouvant influencer sa dynamique.

Tout d'abord les aa sérine et thréonine des protéines composant les IFs peuvent être facilement phosphorylées. En se produisant, ces modifications sont souvent la cause des réarrangements majeurs au sein des IFs (Inagaki et al, 1997). Ce processus est donc nécessaire à la bonne mise en forme du cytosquelette, et des mutations sur les sites de phosphorylations peuvent ainsi être à l'origine de dysfonctionnements plus ou moins importants au niveau cellulaire. Certaines enzymes de phosphorylation de la famille des kinases α associées aux protéines Rho régulent de manière assez fine les interactions entre les filaments d'actine et les IFs (Kosako et al, 1999).

Les protéines composant les IFs sont également les cibles de modification de type O-Glycosylation, touchant les mêmes aa que ceux impliqués dans la phosphorylation (pour revue (Hart et al, 2007; Wells et al, 2004)). Plusieurs enzymes pouvant être responsables de l'ajout ou de la suppression de O-N-acetylglucosamine (O-GlcNac), il a été suggéré que la mise en place de ces modifications au niveau des protéines cibles résultait d'une régulation fine de leur activité. Il est fait référence à ce phénomène sous le nom d'« hypothèse du yin-yang » (Hart et al, 1995; Wells et al, 2004). La O-glycosylation des IFs est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Il a été montré que ce type de modification post-traductionnel peut avoir une fonction de protection de la cellule vis-à-vis de dégâts ou de

stress pouvant lui être causé (Ku et al, 2010). La O-Glycosylation permettrait également de réguler la solubilité, la stabilité et la dégradation des IFs (Srikanth et al, 2010).

Enfin, une étude récente a montré que les IFs pouvaient être sumoylés, ce qui modifie la solubilité de ceux-ci. Une hypersumoylation provoque un défaut de solubilité des filaments et par extension perturbe la cellule les possédant (Snider et al, 2010). Il a été suggéré qu'un « dialogue » existerait entre les différents types de modifications post-traductionnels, pour réguler correctement l'activité des IFs et leur mise en conformation (Snider et al, 2010).

D'autres modifications post-traductionnelles peuvent également réguler les protéines des IFs.

C. Implication dans diverses pathologies

Comme décrit ci-avant, les IFs sont fortement impliqués dans la mise en place de l'architecture et de l'organisation interne des cellules. Les protéines qui les constituent sont codées par de nombreux gènes. Une des caractéristiques importantes de ces gènes est leur expression sélective en fonction du type cellulaire. Des mutations localisées dans ces gènes sont ainsi à l'origine de maladies propres à certains organes ou tissus. Il a été dénombré plus de 80 maladies liées aux IFs et ayant pour cause un défaut dans l'assemblage ou le fonctionnement de ces constituants du cytosquelette (Szeverenyi et al, 2008). Les mutations localisées dans les gènes codant les composants des IFs peuvent avoir différents effets en fonction de la zone de la protéine qu'elles touchent, ainsi que de la pénétrance du gène qu'elles modifient (pour revue (Omary et al, 2004)). En général, ce sont des mutations de type non sens, de courtes délétions ou des insertions touchant la séquence du domaine central (ou tige) de la protéine. Ces mutations sont souvent de type dominant négatif. Ainsi, la présence d'un autre allèle, mais cette fois intacte, ne permet pas d'exprimer un phénotype sauvage. Lorsque les mutations conduisent à une modification de la conformation en hélice α du domaine centrale de la protéine, la pénétrance de celle-ci va être élevée, et causera une maladie plutôt grave (pour revue (Omary et al, 2004)). Cependant, lorsque les mutations touchent des zones situées en dehors de cette partie de la protéine les atteintes seront moins importantes, la maladie sera moins sévère ou la personne touchée possédera une susceptibilité plus grande à d'autres maladies (pour revue (Omary et al, 2004)). Les maladies liées aux IFs peuvent avoir d'autres causes.

Un des groupes de protéines constituant les filaments intermédiaires les plus importants est la famille des cytokératines. Un grand nombre de maladies impliquant les IFs a été associé aux kératines, indifféremment de leur type ou de l'endroit où elles sont exprimées

(Chan et al, 1994; Cheng et al, 1992; Chipev et al, 1992; Rothnagel et al, 1992). D'ailleurs certains dysfonctionnements au niveau de la formation des IFs, ou encore la surexpression d'une kératine par rapport à sa kératine partenaire, entraînent l'apparition d'inclusions cytoplasmiques comme les MDBs. Ces derniers peuvent être observés dans les hépatocytes de certains cas de stéatose hépatique (pour revue (Omary et al, 2009)). Une des premières maladies caractérisée comme étant liée à la présence de mutations au sein des séquences codant les kératines (et en particulier les kératines 5 et 14) est l'épidermolyse bulleuse simplex (Bonifas et al, 1991; Coulombe et al, 1991). Cette maladie a est à l'origine d'un dysfonctionnement des épithéliums se manifestant par des cloques au niveau de la peau.

Des maladies impliquant d'autres protéines que les kératines, et touchant les IFs, ont été découvertes un peu plus tard. C'est le cas des myopathies liées à la desmine (Munoz-Marmol et al, 1998). L'effet de ce type de maladie est analogue à l'épidermolyse bulleuse simplex, avec une dystrophie musculaire en plus. De plus les mutations touchant plus spécifiquement les composants des neurofilaments entraînent parfois l'apparition de maladies de type neurodégénérative (Brenner et al, 2001) ou sclérose (Gros-Louis et al, 2004; Mersiyanova et al, 2000). D'autres pathologies sont dues à de mauvaises interactions entre les IFs et leurs protéines associées, entraînant un dysfonctionnement au niveau de leur dynamique et causant diverses atteintes à l'échelle cellulaire ou ultra-structurale (pour revue (Omary et al, 2004)). Enfin les protéines des filaments intermédiaires perturbées peuvent également servir de marqueurs pour certains types de cancer.

D. Les kératines : un exemple de composant des IFs

Les kératines sont regroupées dans une des familles de gènes les plus importantes chez l'homme. Les membres de cette famille sont des protéines capables de s'associer entre-elles pour constituer les IFs du cytosquelette. Elles sont la plupart du temps exprimées dans les cellules épithéliales on peut trouver par exemple le couple K8/K18 au sein des hépatocytes.

1. Diversité et classification des kératines

Les nombreuses études menées sur les kératines ont montré que cette vaste famille de protéines est impliquée à différents niveaux dans la biologie des organismes les exprimant. Les analyses biochimiques systématiques des protéines issues de différents tissus et types cellulaires ont souligné la diversité de cette famille de protéines et ont permis la réalisation du catalogue des cytokératines humaines (Moll et al, 1982). Celui-ci proposait initialement 19 membres. La classification des kératines en deux grands types dérive de ces études. On

retrouve ainsi sous le type I les kératines acides, alors que les kératines basiques et neutres sont regroupées au sein du type II.

Par la suite, de nouvelles kératines furent identifiées et ajoutées au catalogue des kératines humaines, comme la kératine K20 (Moll et al, 1990). Des kératines spécifiques de certains tissus ont été nommées en fonction de leur homologie avec d'autres kératines et en ajoutant une lettre rappelant leur provenance. Par exemple, la kératine que l'on retrouve dans l'épiderme et celle du palais étaient toute deux désignées comme « K2 », la première portant la lettre « e » (pour « epidermis ») et la seconde la lettre « p » (pour « palate ») (Collin et al, 1992a; Collin et al, 1992b). Désormais, elles sont désignées respectivement comme K2 et K76. Le même principe de notation a été utilisé pour désigner plusieurs isoformes, comme ce fut le cas pour la K6 (Takahashi et al, 1995).

En dehors des kératines situées au niveau des épithéliums, il existe également toutes les kératines entrant dans la composition des cheveux, ongles, pilosité, etc.... L'identification et la caractérisation de ces protéines ont conduit à les nommer selon la méthodologie décrite précédemment, c'est-à-dire avec un suffixe renvoyant à leur origine. Ainsi, en plus de la classification par la nature acide ou basique des protéines, on peut distinguer deux sous-familles de kératines : les cytokératines, entrant dans la composition du cytosquelette des cellules, et les exokératines permettent de constituer les cornes. Ces deux sous-familles de protéines divergent principalement par leur composition, les exokératines étant beaucoup plus riche en soufre.

Ce n'est qu'en 2006 qu'une nouvelle nomenclature, pour l'ensemble des gènes et protéines des kératines de mammifères, fut établie. Elle a été basée sur le catalogue mis au point en 1982 (Schweizer et al, 2006). Elle permet désormais d'être en accord avec les standards de l'Organisation du Génome Humain (HUGO). Elle conserve la répartition en deux types (acide et basique), et compte à peu près autant de cytokératines que d'exokératines.

2. Structure et caractéristiques des cytokératines

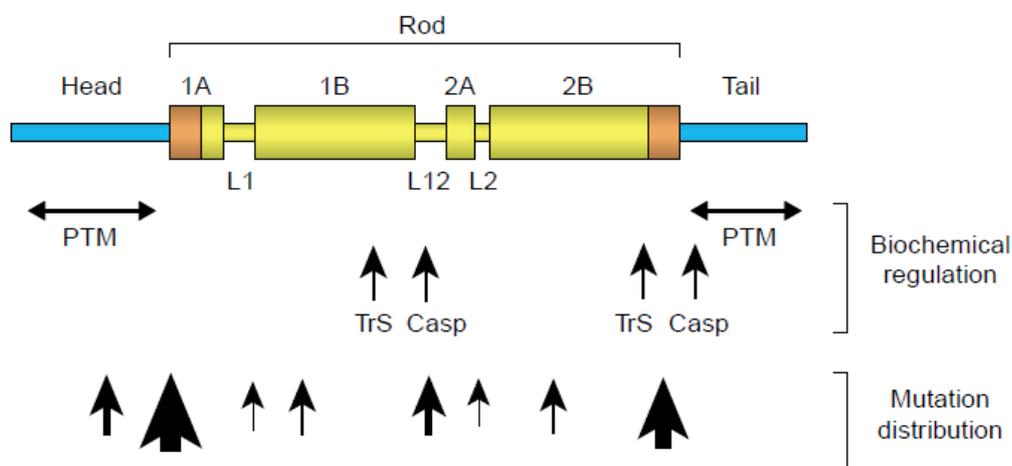
a) Structure des cytokératines

L'ensemble des protéines constituant les IFs possède une structure et une organisation analogue, décrite précédemment. Cette structure correspond à une région centrale, principalement hydrophobe, qui adopte une conformation spatiale en hélice α flanquée de

deux régions amino-terminales ne possédant pas de conformation particulière (pour revue (Parry et al, 2007)).

Les régions amino-terminales de ce type de protéines ne possèdent pas de conformation spatiale particulière. Ces zones sont les plus sujettes aux modifications post-traductionnelles. L'association des ULFs et l'élongation des IFs se feront grâce à ces régions et à leur interaction entre différents ULFs (Figure 28) (Lu & Lane, 1990).

Quand au domaine central, il possède à chacune de ses extrémités une région d'environ 15 aa fortement conservés parmi les protéines des IFs. Ce domaine tige comporte de nombreux aa hydrophobes. Toutefois, même si dans un contexte hélice α , leur présence est nécessaire à une association des protéines en dimère, elle n'est pas suffisante (Figure 29). Un motif protéique d'une douzaine d'aa a été décrit comme apportant une meilleure stabilité au repliement en hélice α de la protéine et permet également la dimérisation de celle-ci (Kammerer et al, 1998; Steinmetz et al, 1998; Wu et al, 2000). Il s'agit des sites « trigger », fortement conservés parmi les protéines constituant les IFs (Figure 29) (Wu et al, 2000).



(d'après (Coulombe & Omary, 2002))

Figure 29 : Représentation schématique de la structure des kératines.

Les deux domaines amino-terminaux sont ici représentés en bleu, ils entourent le domaine tige (« Rod ») en jaune. A chaque extrémité de la tige, les zones en orange représentent des motifs protéiques de 15 à 20 aa hautement conservés. Les régions 1A, 1B, 2A et 2B correspondent aux segments adoptant une conformation en hélice α . Ils sont séparés les uns des autres par des régions de liaison (« linkers ») L1, L1-2 et L2.

La première partie en dessous du schéma représente la localisation des zones de régulation biochimique de la protéine. La double flèche « PTM » indique les zones les plus soumises à des modifications post-traductionnelles comme, par exemple, la phosphorylation ou la glycosylation. La flèche TrS désigne le site « trigger », un motif de 13 aa qui confère une plus grande stabilité aux hélices α , et qui joue un rôle dans l'hétérodimérisation des kératines. Enfin la flèche « Casp » indique les régions sensibles au clivage par les caspases.

La seconde partie indique la distribution de la plupart des mutations touchant les kératines et responsable de maladies. Leur fréquence est fonction de la taille de la flèche.

b) Caractéristiques des cytokératines

Une des particularités des cytokératines est qu'elles ne peuvent s'associer qu'avec des représentants de l'autre groupe de kératines (type1-type2). Les deux protéines s'associent doivent être en proportion équimolaire au sein de la cellule. Un déséquilibre dans la quantité de l'un ou de l'autre de ces constituants peut entraîner un certain nombre de dérèglements au niveau de la cellule. De manière générale, lorsque la quantité d'une des deux kératines s'écarte de l'équilibre équimolaire, les protéines excédentaires sont rapidement dégradées (Lu & Lane, 1990). Un déséquilibre des proportions de kératines peut ainsi marquer l'expression d'un problème au niveau cellulaire, se traduisant par la formation d'inclusions cytoplasmiques de type MDB que l'on retrouve dans les hépatocytes (Zatloukal et al, 2000).

Les cytokératines sont régulées par différents mécanismes au niveau de la cellule. Comme pour tous les constituants des IFs, on peut citer les modifications post-traductionnelles, abordées précédemment. De même pour leurs interactions avec diverses protéines cellulaires. La plectine, la plakophiline ou d'autres protéines cellulaires s'associent aux cytokératines pour permettre leur liaison aux desmosomes et hémidesmosomes (Hatzfeld et al, 2000; Shi & Sugrue, 2000; Steinbock et al, 2000). L'association à certaines protéines, ou l'acquisition de modifications post-traductionnelles, permet également une réponse face à certains stress. C'est le cas lorsque la protéine est hyperphosphorylée (Omary et al, 1998) ou qu'elle s'associe aux protéines de choc thermique (pour revue (Toivola et al, 2010)).

En dehors de leur rôle structurel, il a été montré que les kératines possèdent d'autres fonctions. Les études successives ont permis de mettre en évidence un nombre croissant de ces différents rôles fonctionnels. On peut tout d'abord citer les rôles de protection que ces protéines procurent, comme par exemple au niveau du placenta (Jaquemar et al, 2003), vis-à-vis de l'apoptose (Caulin et al, 2000; Ku et al, 2003; Tao et al, 2009) ou bien encore face à diverses agressions et stress que pourrait subir certains organes tel que le foie (Ku et al, 2003; Zatloukal et al, 2000). Un autre type de fonction décrit est celui de la régulation de la synthèse de nouvelles protéines dans le processus de régénération des blessures (Kim et al, 2006). Enfin, les kératines sont aussi importantes pour la polarisation des cellules épithéliales ainsi que pour le trafic membranaire (Oriolo et al, 2007).

De par leur diversité et leurs spécificités, les cytokératines sont largement utilisées comme marqueurs biologiques pour mettre en évidence la présence de tumeurs, voir même le type de ces tumeurs (pour revue (Moll et al, 2008; Oshima, 2007)).

Les cytokératines constituent, tout comme d'autres composants des filaments intermédiaires, une des bases du cytosquelette ; elles permettent non seulement de structurer la cellule mais également de lui apporter un large éventail de fonctionnalités, rendant ainsi le système de cytosquelette très dynamique.

E. Les MDBs: un exemple d'inclusion cytoplasmique

Il y a près d'un siècle que le professeur Frank B. Mallory a décrit la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les hépatocytes de patients atteints d'une hépatite alcoolique (Mallory, 1911). Par la suite celles-ci ont été associées à de nombreuses autres atteintes hépatiques. Ces inclusions ont été décrites dans un premier temps comme les « corps de Mallory » (MB), avant d'être renommé récemment « corps de Mallory-Denk » (MDBs), en hommage aux nombreuses contributions qu'Helmut Denk a apporté à ce sujet d'étude (Zatloukal et al, 2007). Des inclusions du même genre ont été observées dans des cellules non-hépatiques pour certaines maladies. C'est le cas des corps accumulant des desmines dans certaines myopathies (Goebel, 2003), les agrégations de neurofilaments ou d'internexin- α dans les corps de Lewy pour les maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Parkinson (Cairns et al, 2004; Mayer et al, 1989)

Class of proteins	Name of protein
Keratins	K8, K18 K7, K19 and K20 High molecular weight keratins Hyperphosphorylated keratins Ubiquitinated keratins
Chaperones	Hsp70 Hsp90 family Hsp25 family α -B crystallin
Phosphoepitopes/kinases	MPM-2 Ab (cross-reacts with p62) SMI31 Ab (cross-reacts with p62) Phosphothreonine Phospho-p38 MAPK
Protein degradation machinery	Ubiquitin UBB (+1) p62 (sequestosome 1) Valosin-containing protein and NEDD8 Proteasome subunit β 5, P25, Tbp7
Others	Transglutaminase 2 (in some contexts) Tubulin

(d'après (Zatloukal et al, 2007))

Tableau 4 : Récapitulatif des protéines composant les MDBs

Les MDBs sont constitués de plusieurs classes de protéines qui s'accumulent au sein de l'inclusion (Tableau 4). On y retrouve des protéines chaperons, des protéines de choc thermique, mais les composants principaux sont les protéines K8 et K18 (majoritairement exprimées dans les cellules du foie) (Denk et al, 1979; Franke et al, 1979; Virtanen et al, 1979), mais aussi d'autres cytokératines (K7, K19 et K20) (Tableau 4). Les kératines étant des composants important des IFs du cytosquelette, les MDBs ont la plupart du temps un aspect filamenteux. L'accumulation de protéines au sein de ces inclusions est souvent liée à un dysfonctionnement amenant à la formation de ce type d'inclusion intra-cytoplasmique. Des proportions déséquilibrées de K8 et K18 sont souvent observées au sein des MDBs (Nakamichi et al, 2005). Les kératines ont tendance à être hyperphosphorylées au sein de ces inclusions. Enfin des formes mal repliées des protéines peuvent aussi y être retrouvées. Bien souvent les MDBs sont observés dans des cellules pour lesquelles les mécanismes d'autophagie ou du protéasome sont perturbés ou inactifs (Bardag-Gorce et al, 2001).

L'hypertrophie des hépatocytes est caractéristique de la stéatose hépatique, et est souvent associé aux MDBs. Cependant il est important de noter que tous les hépatocytes hypertrophiés ne contiennent pas systématiquement des MDBs. Alors que tous les hépatocytes présentant ce type d'inclusions ont une taille anormale. Enfin la présence de MDB n'est pas systématique dans les cas de stéatose. Il est ainsi estimé que pour les cas de stéatose non alcoolique, les MDBs sont présent chez 10 à 70% des patients (Wanless & Lentz, 1990), alors que pour les stéatoses alcooliques ils sont parfois détectés dans plus de 70% des cas (Ray, 1987). Toutefois la détection de ces inclusions peut varier en fonction de la méthode utilisée pour les mettre en évidence (Ray, 1987).

Des études cliniques suggèrent ainsi que l'apparition des MDBs est un indicateur d'évolution et d'aggravation des maladies hépatiques (Denk et al, 1979). Les mécanismes de formation de ces inclusions restent encore incertains, mais leur compréhension a pu être améliorée grâce à la mise au point de modèles cellulaire ou murin. Un point important est cependant à déterminer, à savoir si les MDBs et les inclusions de ce type représentent un phénomène de lésions, un mécanisme de défense cellulaire ou bien encore une réponse cellulaire conduisant à l'évolution de la maladie (Zatloukal et al, 2007).

F. Les MRTs : un exemple de tumeur présentant des inclusions intracytoplasmiques

Les tumeurs rhabdoïdes malignes (MRTs) ont été initialement décrites comme une atteinte des reins chez les jeunes enfants (Beckwith & Palmer, 1978). Depuis elles ont été retrouvées parmi un grand nombre de cancer touchant les jeunes enfants. Ces cancers sont souvent reliés à des maladies orphelines. Les MRTs sont des tumeurs très agressives qui peuvent toucher les cellules rénales, mais également certains épithélium et tissus connectifs. Les symptômes varient en fonction de la zone atteinte. Cependant ces tumeurs se caractérisent toutes par la présence de cellules dites « rhabdoïdes » (Beckwith & Palmer, 1978; Haas et al, 1981). Initialement décrites grâce à des méthodes d'immunohistochimie comme des cellules de morphologie circulaire ou polygonale présentant une inclusion intracytoplasmique (Beckwith & Palmer, 1978; Haas et al, 1981). Des analyses ultrastructurelle plus poussée ont permis de montré que ces inclusions consistaient en l'accumulation des composants des IFs sous une forme enroulée. Par conséquent l'apparition de ces MRTs est du à un dysfonctionnement au niveau de la mise en place des IFs. La plupart des composants des IFs s'accumulant dans ces inclusions sont la vimentine et les cytokératines (Tsokos et al, 1989; Vogel et al, 1984), et principalement K8 et K18 (Shiratsuchi et al, 2001). Par comparaison, les inclusions formées par les MRTs sont analogue aux MDBs, bien que la différence entre ces deux structures soit le niveau d'expressions de la vimentine .

Un des facteurs causant l'apparition des MRTs est la présence d'anomalies au niveau du chromosome 22 (Versteeg et al, 1998). L'inactivation, l'altération ou la délétion du gène INI1 sont des facteurs de prédisposition à l'apparition de tumeurs rhabdoïdes (Kohashi et al, 2007; Versteeg et al, 1998). Ce gène est un orthologue de SNF5, découvert chez la levure. Les études fonctionnelle menée sur INI1 on montré qu'il était impliqué dans le processus de remodelage de la chromatine, il peut donc avoir un effet régulateur sur l'expression de certains gènes. INI1 est également connu comme suppresseur de tumeur peu et être associé à l'expression de différents sarcomes. Cependant même si INI1 est souvent impliqué dans l'apparition des tumeurs rhabdoïdes, un faible nombre de tumeurs rhabdoïde ont été décrite comme possédant une forme parfaitement fonctionnelle de ce gène (Bourdeaut et al, 2007; Fruhwald et al, 2006). Ce qui suggère l'existence éventuelle d'autres facteurs liés à l'apparition des MRTs, voir éventuellement une cascade d'événement sur laquelle INI1 aurait une action, mais ou d'autres facteurs cellulaires pourrait intervenir.

Objectifs du travail

II. Objectifs du travail

A. Construction et amélioration de chimères intergénomiques 1a/2a de HCV

Durant de nombreuses années, l'étude de HCV a été handicapée par l'absence d'un système cellulaire permettant de produire et de propager ce virus. Ce n'est qu'en 2005, avec la mise au point du modèle HCVcc, que ce problème fut en grande partie résolu. La production virale initialement faible a été améliorée par diverses approches qui ont été abordées dans ce manuscrit. Cependant si la souche JFH-1 (HCV de génotype 2a) se propage en culture cellulaire la propagation des autres génotypes de HCV restait limitée à l'époque où nous avons entrepris nos recherches.

Un des objectifs de cette thèse fut de construire une chimère intergénomique de HCV, en substituant les séquences codant les protéines structurales et les protéines p7 et NS2 de génotype 2a (de JFH1) par les séquences homologues du HCV de génotype 1a (souche H77). Cette approche nous permettait de pallier le manque de propagation du HCV de génotype 1a et nous permettrait ensuite d'étudier les propriétés de la particule virale à dominante 1a. Néanmoins, si nous sommes parvenus à établir en culture cellulaire une chimère de génotype 1a/2a, sa propagation restait faible. Tenant compte du fait que la protéine NS5A avait un rôle important dans la formation des particules virales infectieuses, nous avons alors également substitué les séquences NS5A de génotype 2a par celles correspondant du génotype 1a. Cette approche si elle se concrétisait nous permettrait de confirmer l'importance de la protéine NS5A et d'envisager par la suite des substitutions progressives des séquences du HCV de génotype 2a par celles de génotype 1a en vue de reconstituer un HCV 1a plus infectieux en culture cellulaire.

Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation pour soumission.

B. Analyse d'un clone cellulaire d'hépatocyte présentant une structure intracytoplasmique inhabituelle

Durant la mise au point d'un outil pour l'étude de la transmission de HCV par contact de cellule à cellule, nous avons isolé un clone cellulaire d'hépatocyte présentant une structure intra cytoplasmique tout à fait particulière qui la distinguait des inclusions cytoplasmiques décrites dans diverses études. Ces dernières sont des structures intracellulaires qui peuvent être observées au sein des cellules impliquées dans différentes maladies. Leur structure est généralement filamenteuse et elles sont constituées la plupart du temps par une agrégation de filaments intermédiaires (IFs). Celle-ci est causée souvent par un problème au niveau des composants des IFs dû à des mutations dans la séquence des protéines formant les IFs, à un défaut au niveau des protéines cellulaires associées à ceux-ci ou à un déséquilibre stoechiométrique entre les différents composants de ces structures. Dès lors, nous avons cherché à mieux caractériser notre clone cellulaire en essayant de différencier nos corps intra cytoplasmiques des inclusions cytoplasmiques observées dans les hépatocytes et caractéristiques de certaines pathologies.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Delavalle P.Y.*, Alsaleh K.*, Pillez A., Cocquerel L., Allet C., Dumont P., Loyens A., Leteurtre E., Omary M.B., Dubuisson J., Rouillé Y. and Wychowski C. Hepatocyte-derived cultured cells with unusual cytoplasmic keratin-rich spheroid bodies. (2011) ECR Manuscript accepted. *equally contributing authors

Résultats

III. Résultats, première partie

Construction et amélioration de chimères intergénomiques 1a/2a de HCV

A. Introduction

Le virus de l'hépatite C est un pathogène qui touche l'Homme. Une infection persistante est observée chez plus de 70% des patients infectés. Plus de 170 millions de personnes à travers le monde sont chroniquement infectées par HCV. Ces patients courent le risque de développer plusieurs types d'atteintes hépatiques, tel que la fibrose, la cirrhose, voir le carcinome hépatocellulaire (Alter, 2005; Shepard et al, 2005). Il n'existe aucun vaccin pour lutter contre HCV et le traitement actuel consiste en l'utilisation conjointe d'IFN α pegylé et de ribavirine (Lee et al, 2004; Schiff, 2007). Les différentes souches de HCV sont classées parmi six génotypes majeurs, parmi lesquels on retrouve les génotypes 1a et 1b majoritairement représentés en Europe et aux États-Unis.

Le virus de l'hépatite C est un petit virus enveloppé, dont le génome est codé par un ARN simple brin de polarité positive. Classé au sein de la famille des *Flaviviridae*, ce virus est le seul représentant du genre *Hepacivirus* (Lindenbach & Rice, 2005; Pringle, 1999; Robertson et al, 1998). Le génome viral mesure près de 9,6 kb, possède un seul cadre ouvert de lecture codant une seule polyprotéine et est encadré de deux régions non-codantes fortement conservées et localisées aux extrémités 5' et 3'. Ces deux régions contiennent des éléments essentiels à la traduction et à la réplication de l'ARN viral (Friebe & Bartenschlager, 2002; Friebe et al, 2005; Luo et al, 2003; Rijnbrand & Lemon, 2000; Tsukiyama-Kohara et al, 1992; You & Rice, 2008). La polyprotéine quant à elle est composée de près de 3010 aa et est maturée par des protéases d'origine cellulaire et virale. La maturation de ce précurseur polyprotéique libère d'une part les protéines structurales : C, E1 et E2, qui constituent les particules virales ; et d'autre part les protéines non-structurales p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B. Les protéines NS3 à NS5B sont nécessaires à la réplication (Penin et al, 2004; Suzuki et al, 2007), alors que p7 et NS2 sont dispensables dans ce processus (Lohmann et al, 1999). Cependant p7, NS2, NS3 et NS5A sont des facteurs viraux essentiels à la formation, l'assemblage et la sécrétion des virus infectieux (Jirasko et al, 2008; Jones et al, 2007; Masaki et al, 2008; Miyanari et al, 2007; Phan et al, 2009). Enfin une nouvelle protéine virale, codée au niveau de la séquence de la protéine de capsid a également pu être caractérisée (Eng et al, 2009; Roussel et al, 2003; Walewski et al, 2001; Xu et al, 2001).

L'absence d'un système de culture cellulaire permettant la propagation de HCV a été un sérieux handicap dans l'étude du cycle viral. Cependant, différents moyens ont été mis en place pour contrebalancer ce défaut (Bartosch et al, 2003b; Kolykhalov et al, 1997; Lohmann et al, 1999; Yanagi et al, 1997). Le développement d'un système permettant la propagation du

virus de la souche JFH-1 (génotype 2a) de HCV a en particulier contribué d'importantes avancées dans la compréhension du cycle viral de ce pathogène (Lindenbach et al, 2005; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005). Des particules infectieuses ont pu être produites pour d'autres génotypes (1a et 1b), mais sans obtenir de production importante (Pietschmann et al, 2009; Yi et al, 2006). Des virus recombinant basés sur le JFH-1 ont été construits en remplaçant la séquence codant la région des protéines de la capsidie jusque NS2 de génotype 2a par leur homologue correspondant dans d'autres génotypes de HCV (Lindenbach et al, 2005; Pietschmann et al, 2006; Scheel et al, 2008; Yi et al, 2007).

Par ailleurs NS5A étant une protéine virale essentielle à la réplication du génome de HCV, certains travaux récents suggèrent que cette protéine pourrait également jouer un rôle important dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses (Appel et al, 2008). Plusieurs études ont pu montrer que la substitution de la séquence codant NS5A de la souche JFH-1 par la séquence homologue issue d'autre génotype permettait d'obtenir des recombinants fonctionnels.

Dans cette étude nous nous sommes attachés à développer un recombinant intergénotypique 1a/2a de HCV, basé sur le JFH-1, capable de se propager efficacement en culture cellulaire. Après avoir sélectionné et stabilisé les mutations d'adaptation nécessaires à la propagation de notre chimère, la totalité de la séquence codant la protéine NS5A de la souche JFH-1 a été remplacée par son homologue de génotype 1a. Ce nouveau virus recombinant a été adapté à son tour à la culture cellulaire. Nous avons pu noter que l'ensemble des mutations d'adaptation que nous avons ainsi sélectionnées améliore l'infectivité de notre chimère 1a/2a.

B. Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

Les cellules de la lignée Huh-7 (Nakabayashi et al, 1982) et Huh-7w7 (Rocha-Perugini et al, 2009) sont cultivées dans le milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » complété par 100 nmol d'aa non-essentiels et 10% de sérum de veau fœtal (DMEM complet), à 37°C et en présence de 5% de CO₂.

II. Construction des chimères

Les différentes chimères de cette étude ont toutes été construites dans le plasmide pJFH-1, contenant l'ADNc de l'intégralité du génome de la souche JFH-1 de HCV (génotype 2a). Les séquences de génotype 1a ont été amplifiées à partir du plasmide pG-HCV17-9389 (Grakoui et al, 1993b) contenant l'ADNc du génome de la souche H77 de HCV (génotype 1a). Les séquences d'intérêt ont été amplifiées par PCR en utilisant le kit « Expand High Fidelity PCR system, dNTPack » et en suivant les recommandations d'utilisation de ce produit. Par la suite, les amplicons ont été introduits au sein du plasmide pJFH-1 en utilisant des sites uniques de clonage. Les diverses mutations d'adaptation ont été introduites en suivant la même méthode. Pour plus de simplicité lors de la réinsertion des séquences 1a contenant les mutations d'adaptation et pour utiliser des sites uniques, nous avons délété, dans le plasmide recombinant pJFH1/ S1a-NS2-1a2a, la séquence codant les protéines non-structurales de HCV entre les sites AvrII et SgrAI. Dans ce dernier cas, le plasmide complet était régénéré à la fin du clonage en introduisant la séquence manquante entre les sites NotI et XbaI qui ont été conservés dans toutes les constructions. Chaque construction était systématiquement séquencée pour vérifier l'intégrité de la construction générée. (Figure 1).

III. Transcription in vitro

Pour générer l'ARN génomique des différentes constructions réalisées dans cette étude, les plasmides porteurs de l'ADNc d'intérêt ont tout d'abord été linéarisés du côté 3' par l'enzyme de restriction XbaI puis traités par l'enzyme Mung Bean Nuclease pour générer une extrémité franche correspondant à l'extrémité exacte du génome de JFH1. Après extraction phénol/ chloroforme/IAA (alcool isoamylique), les ADNs étaient précipités une nuit à -20°C, avant d'être repris dans de l'eau « nuclease free » à une concentration de 1µg/µl. L'ADN génomique ainsi préparé servait de matrice pour la réaction de transcription *in vitro* réalisée grâce au kit MEGAscript T7 distribué par la société Ambion, en suivant les recommandations

d'utilisation de ce produit. La réaction a été mise en place en utilisant du matériel certifié « nuclease free », et le milieu réactionnel a été incubé pendant 4h à 37°C. Au terme de l'incubation, un volume adéquat de TurboDNase (fournie avec le kit) a été ajouté au milieu réactionnel pendant 15 minutes et le tout a été incubé à 37°C pour dégrader la matrice d'ADN. La réaction a ensuite été stoppée et les transcrits précipités par l'ajout d'eau « nuclease free » et de chlorure de lithium puis placé à -20°C sur la nuit. Les ARNs ont été récupérés après centrifugation et lavage par de l'éthanol à 70%. Le culot d'ARN a été repris dans de l'eau « nuclease free » et la concentration a été ajustée à 1µg/µl (Delgrange et al, 2007). A ce stade, les ARNs sont aliquotés et conservés à -80°C.

IV. Electroporation

L'ARN des chimères, transcrit *in vitro*, est ensuite introduit dans les cellules de la lignée Huh-7 par la technique de l'électroporation (Kato et al, 2003). La veille de l'électroporation, des cellules confluentes sont réparties au demi dans des boîtes de 100mm et mises à incuber à 37°C pendant la nuit dans une étuve saturée à 5% de CO₂. Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS, trypsinées et reprises finalement après centrifugation à une concentration de 10x10⁶ cellules/ml dans du milieu OptiMEM.

Une quantité de 10 à 20µg d'ARN génomique est alors ajoutée à un volume de 400µl de suspension cellulaire et placée dans une cuvette pour électroporation, possédant un espace de 2mm, commercialisée par la société Bio-Rad. Le pulse électrique est délivré par le Gene Pulser X-Cell de la société Bio-Rad, en utilisant les paramètres suivant : 1000µF ; 150V ; résistance infinie. Les cellules électroporées ont ensuite été transférées dans du milieu DMEM complet à 4°C pendant 10 minutes, avant d'être réparties dans différents contenants et mis en incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂. (Figure 2).

V. Infections successives

Une partie des cellules transfectées, ou infectées, ont été cultivées en flasque de 25cm³. Les surnageants ont été prélevés entre les différents entretiens de ces cellules, et le niveau d'infection a été suivi par immunofluorescence indirect. Lorsque la quasi-totalité du tapis cellulaire a été infecté par le virus, le surnageant correspondant à cette étape a été utilisé pour infecter une flasque contenant des cellules Huh-7 naïve à l'infection. Ainsi les cellules Huh-7 ont été mises en contact pendant 4h avec 1 ml de surnageant infectieux. Au terme des 4h d'incubation, 5ml de milieu DMEM complet a été ajouté à la flasque, et les cellules nouvellement infectées ont été entretenues. (Delgrange et al, 2007) (Figure 3).

VI. Titration

Les surnageants de cultures de cellules transfectées, ou infectées, ont été prélevés à différents temps. Les titres viraux ont été déterminés ensuite. La veille de l'infection, des cellules de la lignée Huh-7 ont été platées à une concentration de 5.6×10^3 cellules/ml dans des plaques 96 puits. Le surnageant prélevé plus tôt a été dilué en série et par un facteur de 10, avec du DMEM complet, puis utilisé pour infecter les cellules platées auparavant. 72h après inoculation les cellules ont été fixées par du méthanol et les cellules transfectées ou infectées ont été traitées avec l'anticorps A4 (dirigé contre la protéine E1 de HCV) suivi d'une révélation à l'aide d'un anticorps secondaire marqué à la Fluoresceine ou la rhodamine. Le nombre de foyers infectieux a alors été évalué, il est exprimé en FFU (Foyer Formant Unité) par ml de surnageant comme précédemment décrit (Zhong et al, 2005).

VII. Immunoempreinte

Les extraits cellulaires ont été préparés en utilisant un tampon de lyse contenant 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, et un cocktail d'inhibiteur de protéase (Complete ; Roche). La concentration des extraits a ensuite été évaluée en utilisant la méthode de Bradford. Ainsi 10 à 20 µg de protéines ont été séparées par SDS-PAGE, puis transférées, par Western Blotting, sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL ; Amersham). Enfin, les protéines d'intérêt ont été détectées grâce à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques, suivi d'une révélation à l'aide d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Finalement, des films photosensibles ont été exposés avec les membranes activées par chemiluminescence pour détecter les immuns complexes (Alsaleh et al, 2010; Delgrange et al, 2007).

VIII. Immunofluorescence indirecte

Des cellules Huh-7 transfectées ou infectées ont été cultivées sur des lamelles en verre, puis fixées avec une solution contenant 4% de paraformaldehyde. Les cellules ont ensuite été perméabilisées pendant 20 minutes en utilisant une solution de PBS contenant 0.05% de triton X100. Par la suite, elles ont été incubées en présence de l'anticorps primaire pendant 1h, avant d'être lavées par une solution de PBS et incubées avec l'anticorps secondaire pendant 30 à 45 minutes comme précédemment décrit (Rouille et al, 2006).

Les images ont été obtenues grâce à un microscope Axiophot 2 (Zeiss), possédant une caméra de type « coolsnap ES » (photometrix), et en utilisant le logiciel Metavue (Zeiss).

IX. RT-PCR

L'ARN total des cellules infectées ou transfectées a été extrait en utilisant du TRI-reagent (Sigma). Des primers spécifiques ont été conçus pour couvrir l'intégralité des différents génomes chimériques de cette étude. La Reverse Transcription a été réalisée avec l'enzyme « Expand Reverse Transcriptase » (Roche) et en suivant les recommandations d'utilisation. Par la suite la PCR a été réalisée en utilisant le kit « Expand High Fidelity PCR system, dNTPack » (Roche), et les amplicons ont été directement séquencés après purification, en utilisant la méthode Sanger avec un séquenceur de type ABI Prism (Applied Biosystem).

X. Quantification des équivalents génomes

Les surnageants prélevés à différents moments ont également permis d'évaluer la quantité d'équivalents génomes relargués dans le milieu extracellulaire. Une RT-PCR quantitative a été réalisée à partir des différents échantillons selon la méthode décrite par Castelain et collaborateurs (Castelain et al, 2004).

C. Résultats

I. Construction d'une chimère 1a/2a : « S1a/2a »

Pour propager un virus exprimant les protéines structurales de génotype 1a, nous avons construit un recombinant intergénomique de HCV en remplaçant la séquence codant les protéines structurales ainsi que les protéines p7 et NS2 de la souche JFH-1 par les séquences correspondant de génotype 1a (H77) (Grakoui et al, 1993b). Cette construction a été appelée JFH-1/ S1a-NS2-1a2a. La séquence couvrant les aa 1 à 1027 a ainsi été introduite au sein du JFH-1 (Figure 4A). Les cellules Huh-7 ont été transfectées avec l'ARN chimérique, transcrit *in vitro*. Les cellules ont alors été entretenues et repiquées tous les 5 à 7 jours pour les maintenir subconfluentes durant toute l'expérience, comme précédemment décrit pour le JFH-1 (Delgrange et al, 2007). L'évolution de la chimère en HCVcc a été suivie grâce au marquage des protéines virales par immunofluorescence et par analyse en immuno empreinte. Cependant, au fil des différents passages nous avons constaté que le signal associé à la détection des protéines virales diminuait progressivement avant de disparaître après un mois. Ces observations suggèrent que ce premier virus chimérique n'est pas capable de se propager en culture cellulaire.

Des données publiées par Ma et collaborateur (Ma et al, 2008) ayant démontré l'importance de la mutation Q1251L (Yi et al, 2007) au niveau du premier domaine de la partie hélicase de NS3 en terme de production de particules virales infectieuses, nous avons réintroduit cette substitution au sein de notre chimère JFH-1/ S1a-NS2-1a2a (Figure 4A).

L'ARN transcrit de cette chimère a été introduit par électroporation dans les cellules Huh-7. Les cellules transfectées ont été maintenues en culture et la détection des protéines virales a été analysée par immunofluorescence indirecte ou par immunoempreinte. Nous avons observé par immunofluorescence indirecte le maintien du signal pour les protéines virales de HCV jusqu'au 17-21 ème jour puis une amplification des cellules marquées suggérant une diffusion des particules virales infectieuses en culture cellulaire. Ce résultat est corrélé par les analyses faites par immunoempreintes, montrant également une augmentation des signaux obtenus pour E2 et la capsid (Figure. 4B). Ces résultats suggèrent que vraisemblablement le génome viral a acquis certaines mutations qui restaurent son infectiosité en culture cellulaire.

II. Identification de mutations impliquées dans l'adaptation de la chimère S1a-NS2-1a2a à la culture cellulaire.

Pour identifier les mutations responsables de l'adaptation de la chimère S1a-NS2-1a2a-L (Q1251L) à la culture cellulaire, nous avons adopté une approche similaire à celle utilisée par Delgrange et collaborateurs qui, par infections successives, avaient stabilisé les mutations au sein du génome viral de JFH1 (Delgrange et al, 2007). Comme le virus était sécrété après transfection vers j17- j21, nous avons utilisé le surnageant j21 pour infecter des cellules naïves Huh-7. Le surnageant des cellules nouvellement infectées était ensuite utilisé pour infecter à nouveau de nouvelles cellules (Figure 3) Nous avons ensuite utilisé les surnageants produits au douzième jour car à ce stade de l'expérience pratiquement toutes nos cellules étaient infectées. Quatre infections ont été faites pour stabiliser les mutations de notre chimère adaptée à la culture cellulaire. Ensuite, les ARN totaux des cellules infectées ont été purifiés et l'ARN de la chimère S1a-NS2-1a2a-L a été amplifié par RT-PCR et le génome viral a été séquencé. Le séquençage a montré que la mutation Q1251L était maintenue dans la séquence de NS3. Par ailleurs, nous avons identifié deux mutations dans le génome de la chimère. La première mutation est présente dans la séquence codant la protéine E1 et correspond au changement d'une isoleucine en valine à la position 262 (aa I262V, nt A1148G). La seconde mutation, quant à elle, correspond à l'insertion d'une proline entre les positions 862-864 de la séquence protéique (aa P862-864, nt CCC 2947-2954). Cette insertion se fait dans une séquence peptidique où il existe déjà deux prolines. L'insertion d'un aa dans la séquence virale est inhabituelle. Tout comme pour l'adaptation du JFH1 en culture cellulaire (Delgrange et al, 2007), nous avons identifié dans le génome viral de la chimère très peu de mutations.

III. Analyse des génomes viraux chimériques exprimant les différentes mutations

Pour déterminer dans quelle mesure les mutations d'adaptation que nous avons sélectionné possédaient un effet sur la chimère S1a-NS2-1a2a-L, nous les avons réintroduites seule ou en combinaison au sein du génome parental. Différentes chimères ont ainsi été générées et appelées S1a/VL, PL et VPL (Fig. 5A).

Comme précédemment décrit, l'ADN de ces constructions a été transcrit in vitro et l'ARN a été électroporé au sein de cellules Huh-7. Des relevés ont été régulièrement effectués pendant plusieurs jours. Dans tous les cas, nous avons observé une amplification rapide de la détection des protéines virales lorsque celles-ci étaient révélées par immunofluorescence, sur

les cellules transfectées et entretenues sur plusieurs jours, ou par immunoempreinte sur des extraits cellulaires (données non présentées). Ces résultats suggèrent que les particules infectieuses se propagent en culture cellulaire plus rapidement que les virus chimériques S1a-NS2a-1a2a-L. Pour confirmer ce résultat, une quantification des génomes viraux et un titrage des surnageants infectieux ont été effectués (Fig. 5 B et C). Nous avons observé une sécrétion plus rapide des particules virales infectieuses dans les surnageants de cellules transfectées pour chacune des chimères par comparaison avec la chimère parentale (Fig. 5B). La sécrétion des particules virales s'accompagne également d'une augmentation des équivalents génomes présents dans les surnageants de chacune des chimères (Fig. 5C). Une différence de un log est observée entre la chimère parentale et la chimère possédant les deux mutations d'adaptation. Nos résultats suggèrent que la chimère parentale est plus infectieuse lorsque les deux mutations sont introduites dans son génome viral. Il semble donc que ces mutations possèdent un effet synergique sur la chimère S1a-NS2-1a2a-L.

IV. Analyse des chimères S1a/V, P et VP sans la mutation Q1251L

Nous avons ensuite cherché à savoir quel serait l'effet des mutations d'adaptation I262V et P862-864 en dehors du contexte de la mutation Q1251L localisée dans la partie hélicase de la protéine NS3 de JFH1 (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007). Pour répondre à cette question, les différentes constructions chimériques portant les mutations d'adaptation ont été générées sans la mutation Q1251L. Ces différentes constructions ont été appelées S1a/V, P et VP et celles de JFH1/ S1a-NS2-1a2a (notée S1a) et S1a/VPL ont été utilisées comme témoin. L'ARN transcrit *in vitro* des différentes chimères a été introduit dans les cellules Huh-7 par électroporation et les cellules ont été entretenues comme décrit ci-dessus. Les analyses par immunoempreintes réalisées sur les extraits cellulaires préparés à partir des différentes cellules Huh-7 électroporées avec les chimères montrent que le signal de détection pour la protéine (E2) décroît rapidement pour celles qui ne possèdent pas la mutation Q1251L (Figure 6B), mais seulement dans le contexte des chimères ne possédant qu'une seule mutation d'adaptation. Ce résultat est à comparer avec le témoin de transfection S1a-NS2-1a2a-VPL. Cependant, il est à noter que la chimère S1A-NS2-1a2a-VP se maintient faiblement en culture cellulaire, puis que 30j après électroporation, le signal de détection s'amplifie suggérant que des mutations d'adaptation à la culture cellulaire sont produites pour compenser l'absence de la mutation Q1251L (Figure 6B). Comme précédemment décrit, des infections successives ont été réalisées pour stabiliser les mutations d'adaptation puis l'ARN a été séquencé par RT-PCR pour identifier les mutations responsables de l'infectiosité de la chimère S1a/VP.

L'analyse des données de séquençage du génome chimérique nous a permis d'observer que les mutations I262V et P862-864 étaient toujours présentes. Cependant, une nouvelle mutation avait été identifiée et correspondait au changement d'une glutamine vers une lysine en position 1221 (aa Q1221K, nt C4025A). Il est intéressant de noter que cette nouvelle mutation, qui semble compenser l'absence de la mutation Q1251L, est située dans le premier domaine hélicase de la protéine NS3 tout comme la mutation Q1251L décrite par Ma et collaborateurs (Ma et al, 2008). Nos résultats suggèrent que le domaine hélicase de la protéine NS3 joue un rôle important dans l'adaptation des chimères inter génotypiques 1a/2a au système HCVcc.

V. La mutation Q1221K restaure l'infectiosité des chimères 1a2a

Pour déterminer si la mutation Q1221L permet de restaurer l'infectiosité des chimères S1a-NS2-1a2a-sL, celle-ci fut introduite dans les différentes chimères. Cela a conduit à l'obtention de nouvelles constructions appelées : S1a/K, VK, PK et VPK (Figure 7A). L'approche expérimentale pour ces nouvelles chimères est identique à ce qui a été décrit ci-dessus. Le suivi par immunoempreinte et par immunofluorescence des cellules transfectées par l'ARN de ces chimères montrent que celles-ci s'amplifient rapidement en culture cellulaire comme les chimères avec la mutation Q1251L (Figure 7B et données non présentées). Les titres infectieux pour chaque chimère ont été évalués à 3j et 7j (Figure 7C). Les résultats montrent que, tout comme pour les chimères avec la mutation Q1251L, l'infectiosité des chimères est meilleure lorsque les trois mutations sont présentes sur le génome viral. En présence de la mutation Q1221K, les mutations I262V et P 862-864 ont un effet synergique sur la chimère S1a-NS2-1a2a-K. L'infectiosité de la chimère S1a-NS2-1a2a-VPL est analogue à celle de S1a-NS2-1a2a-VPK. L'effet de la mutation Q1221K est analogue à ce qui est observé pour la mutation Q1251K décrit par Ma et collaborateurs (Ma et al, 2008).

VI. Substitution de la séquence NS5A de JFH1 par celle de H77.

Il a été montré que la protéine virale NS5A interagit avec la protéine de capsid C (Masaki et al, 2008) et qu'elle joue également un rôle important dans l'assemblage des nouveaux virions (Appel et al, 2008). Pour ces différentes raisons, nous avons cherché à substituer les séquences codant NS5A de JFH1 par celles de H77 (1a) pour améliorer l'infectiosité des virus chimériques 1a2a. La construction chimérique correspondant à cette substitution a été appelée S1a/VPL/5A. Une amplification de la chimère est observée après

deux à trois semaines. En employant la même méthodologie décrite ci-dessus, nous avons identifié cinq mutations. L'une d'entre-elles est localisée dans la séquence codant la protéine NS4B (aa H1961Y , nt C6245T) alors que les quatre autres sont localisées dans la séquence codant la protéine NS5A (aa K2111T, nt A6696C ; aa R2283Q, nt G7212A ; aa S2356P, nt T7430C et aa D2416G, nt A7611G). Comme indiqué dans la Figure 8A, les mutations K2111T et R2283Q se localisent respectivement dans le domaine I et II de NS5A (Tellinghuisen et al, 2004) tandis que les mutations S2356P et D2416G le sont dans le domaine III de NS5A (Tellinghuisen et al, 2004).

VII. Analyse des mutations d'adaptation localisées dans NS4B et NS5A

Afin de limiter les analyses concernant les mutations identifiées dans NS4B et NS5A, nous avons décidé de constituer deux groupes de mutants chimériques. Les mutations présentes dans la séquence codant NS4B et les deux premiers domaines de NS5A ont été réunies dans la construction S1a/VPL/5A-YTQ et la totalité des mutations a été réunie dans la construction S1a/VPL/5A-YTQPG. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer comment ces différentes constructions chimériques se comportaient en répllication. Toutes ces mutations ont été placées dans une construction exprimant la luciférase (RLuc) et transfectées dans des cellules Huh-7w7 pour étudier la répllication en absence de toute infection. Nous avons observé que les chimères S1a/VPL/5A et S1a/VPL/5A-YTQ sont moins efficaces en répllication que la chimère S1a/VPL. Par contre, la chimère S1a/VPL/5A-YTQPG semble aussi efficace que la forme S1a/VPL (Figure 9).

Puis, comme précédemment décrit, les protéines virales de ces chimères ont été analysées à différents temps et les particules virales infectieuses ont été titrées après la transfection des cellules. Comme observé dans la Fig. 10A, l'expression de la glycoprotéine E2 est détectable dès le j3 pour les chimères notées S1a/VPL/5A -YTQ, S1a/VPL/5A-YTQPG et S1a/VPL, cette dernière chimère servant de contrôle. Cependant, pour la chimère S1a/VPL/5A, nous constatons que la détection de la protéine E2 apparaît entre les j10 et J14, ce qui correspond au début de l'adaptation de la chimère à la culture cellulaire. Nous avons constaté également que la chimère S1a/VPL/5A-YTQ semble moins efficace que la S1a/VPL/5A-YTQPG puisqu'à j3 la détection de la protéine E2 est plus faible. Ce résultat se vérifie par la titration des virus chimériques (Figure 9C), permettant de constater que la chimère S1a/VPL/5A-YTQ est 10 fois moins infectieuse que la chimère S1a/VPL/5A et environ 50 fois moins que la chimère S1a/VPL/5A-YTQPG. Cependant, les titres infectieux

semblent être ensuite comparables pour les chimères S1a/VPL/5A-YTQ et S1a/VPL/5A-YTQPG. Ceci pourrait être dû à un retard dans la sécrétion des particules virales infectieuses. Ce retard est également observé pour la chimère S1a/VPL/5A dont le titre infectieux progresse en fonction du temps et des passages. Nos résultats indiquent que les nouvelles mutations d'adaptation avec la substitution de la séquence NS5A de JFH1 par celle de H77 confèrent à la chimère S1a-NS2-1a2a une meilleure infectiosité des particules virales.

D. Discussion

Si le développement de l'outil HCVcc a permis de réaliser une avancée majeure dans l'étude du virus de l'hépatite C (Lindenbach et al, 2005; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005), ce système ne rend pas totalement compte du comportement des différentes souches de ce virus. A travers plusieurs études, il a été constaté que les comportements des différents génotypes de HCV pouvaient varier, que ce soit au niveau de leur virulence ou face aux traitements mis en place pour lutter contre l'infection. La mise au point de différentes chimères intra ou intergénotypiques a été une première piste explorée pour s'affranchir du biais que représente l'utilisation d'un unique génotype dans l'étude du virus de l'Hépatite C (Gottwein et al, 2007; Gottwein et al, 2009; Jensen et al, 2008; Kato et al, 2007; Koutsoudakis et al, 2006; Lindenbach et al, 2005; Pietschmann et al, 2006; Pietschmann et al, 2009; Scheel et al, 2008; Yi et al, 2007).

I. Adaptation à la culture cellulaire d'une chimère virale de type 1a/2a

A partir du constat que des recombinants intergénotypiques de HCV existent dans la population mondiale (Bhattacharya et al, 2011; Kalinina et al, 2002; Morel et al, 2010), nous avons supposé qu'il était possible de construire des chimères du virus de l'hépatite C entre le génotype 1a (souche H77) (Kolykhalov et al, 1997; Yanagi et al, 1997) et l'isolat JFH-1 de génotype 2a (Wakita et al, 2005). Notre stratégie initiale fut de substituer les séquences codant l'ensemble des protéines structurales, p7 et NS2 au sein de la souche JFH-1, par leurs homologues de la souche H77. Malheureusement, la chimère produite était incapable de se propager en culture cellulaire, laissant suggérer qu'un élément essentiel au virus chimérique était manquant pour lui permettre une propagation efficace. En parallèle de notre étude, Yi et collaborateurs avaient montré que la présence d'une mutation au sein de la protéine NS3, la mutation Q1251L, avait un rôle important dans l'assemblage des particules virales de type 1a/2a (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007). Nous avons observé en insérant cette mutation dans nos constructions chimériques que celle-ci conduisait, après 2 à 3 semaines, à l'apparition de particules virales infectieuses dans le surnageant de nos cellules transfectées. Nos résultats suggéraient en outre que notre chimère avait acquis vraisemblablement d'autres mutations pour lui permettre de se propager.

Deux mutations ont été ainsi identifiées en plus de la mutation Q1251L. La première, la mutation I262V, est localisée dans la séquence codant la glycoprotéine E1. Le changement

d'une isoleucine en valine est observé dans beaucoup d'isolats de HCV et la position de cet aa semble être bien conservée. L'effet de ce changement sur la glycoprotéine E1 peut avoir des effets multiples. Elle peut permettre un meilleur bourgeonnement des particules virales ou autoriser une meilleure interaction avec les récepteurs pour l'entrée du virus dans les cellules cibles. L'adaptation d'une chimère 1a2a en culture cellulaire avait permis de sélectionner une mutation dans E1 en position Y361H (Yi et al, 2007). De façon surprenante cette mutation se trouve dans le domaine transmembranaire de E1. Il pourrait être suggéré que cette modification dans le TMD de E1 influencerait l'ectodomaine de E1 et favoriserait une interaction E1E2 plus favorable pour l'entrée du virus dans la cellule. Un tel phénomène a été suggéré récemment (Maurin et al, 2011). Cette mutation pourrait également améliorer l'interaction entre E1 et la capsid, et ainsi moduler le processus de morphogénèse des particules virales (Lo et al, 1996). La seconde mutation concerne l'insertion d'une proline dans la protéine NS2, P862-864, au niveau d'une section extra-membranaire de cette protéine (Yamaga & Ou, 2002), dans une zone où deux aa proline sont déjà présents. Le motif de trois prolines constitué ici n'est retrouvé dans aucun alignement. Le rôle de NS2 dans le cycle viral n'est pas encore clairement défini. Cette protéine intervient à plusieurs moments clés. L'exemple de l'outil réplicon nous montre qu'elle n'est pas indispensable au fonctionnement du complexe de réplication viral (Blight et al, 2000; Lohmann et al, 1999). Elle peut néanmoins moduler son action, notamment en intervenant dans la phosphorylation de NS5A (Liu et al, 1999). L'étude récente menée par Popescu et collaborateur montre aussi qu'elle a un rôle important de médiateur entre les différentes protéines de HCV au moment de l'assemblage des particules virales (Popescu et al, 2011). L'insertion que nous avons observée au niveau de la protéine NS2 peut ainsi avoir différents effets. Le changement survenu au sein de cette protéine peut tout simplement améliorer les interactions entre les différentes protéines virales, et par là améliorer le comportement général du virus lors de l'infection des cellules. Le groupe de Jens Bukh a récemment montré que le couple de protéines core-NS2 permettait de moduler les étapes d'entrée et d'assemblage du virus (Gottwein et al, 2011). Une autre étude montre que NS2 interagit avec les glycoprotéines E1 et E2 au niveau de l'assemblage du virus (Stapleford & Lindenbach, 2011). Par ailleurs, nous avons observé que ces mutations ont un effet synergique lorsqu'elles sont exprimées toutes les deux dans la chimère S1a-NS2-1a2a. Cependant, lorsque l'on compare les titres infectieux de la chimère S1a-NS2-1a2a avec ceux de l'isolat JFH1 adapté à la culture cellulaire (Delgrange et al, 2007), les premiers restent très inférieurs aux seconds. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par d'autres

groupes. En outre, aucune de ces mutations n'est retrouvée dans le génome de la souche H77 (génotype 1a) adapté à la culture cellulaire (Yi et al, 2006).

II. La mutation Q1251L est compensée par la mutation Q1221K

Par ailleurs, nous avons cherché à savoir quel serait le comportement de nos chimères adaptées à la culture cellulaire mais produites en absence de la mutation Q1251L. Nous avons montré que nos chimères perdent leur capacité à se propager efficacement, suggérant que les mutations I262V et P862-864 ne sont pas suffisantes à elles seules pour produire des particules virales infectieuses. Cependant, après un temps d'adaptation, de nouvelles particules virales sont produites. Tout comme Q1251L, la mutation Q1221K est localisée dans le premier domaine de la partie hélicase de NS3 (Kim et al, 1995; Tai et al, 1996) laissant suggérer le rôle important de cette région pour la formation des particules virales infectieuses de la chimère 1a2a. Ma et collaborateur ont montré que la protéine NS3 (Ma et al, 2008), en plus de son rôle de protéase, intervenait au niveau de l'assemblage des particules virales. Des données non publiées de notre laboratoire, ainsi qu'une récente étude de Jones et collaborateurs (Jones et al, 2011) montrent également un effet positif d'une mutation située dans cette région de NS3 sur des mutants de la capsid. Ces données, ainsi que nos résultats, soulignent ici le rôle important que peut jouer NS3 dans la morphogenèse des nouvelles particules virales. Nous pouvons ainsi suggérer que le premier domaine de la partie hélicase de NS3 interviendrait au niveau de la production des particules virales selon un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé. Les hélicases de différents virus, parmi les flaviviridae (Agapov et al, 2004; Jones et al, 2005) ou d'autres familles (King et al, 2001; Taraporewala & Patton, 2004), sont connues pour intervenir dans l'assemblage des particules virales, et les mécanismes sont variés. Nous pouvons supposer que des interactions protéines-protéines, dans lesquelles la protéine NS3 serait impliquée, pourraient expliquer ce phénomène.

III. Substitution de la séquence NS5A de génotype 2a par celle de génotype 1a dans la chimère 1a2a

La protéine NS5A apparaît comme une protéine multifonctionnelle au niveau du cycle viral (Appel et al, 2008; Huang et al, 2005; Masaki et al, 2008; Tellinghuisen et al, 2008a; Tellinghuisen et al, 2008b). Elle est capable de se lier à l'ARN, elle participe au complexe de réplication viral, et de façon tout à fait surprenante, elle joue un rôle important au niveau de l'assemblage des particules virales grâce aux nombreuses interactions avec les autres protéines de HCV (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008; Tellinghuisen et al, 2008a). La

chimère S1a-NS2-1a2a étant principalement constituée des protéines structurales, de p7 et de NS2, nous avons cherché à savoir si l'introduction de la séquence codant la protéine NS5A de génotype 1a pouvait améliorer l'infectiosité de nos particules virales chimériques. De nouvelles mutations ont été identifiées. L'une est présente dans la partie carboxy terminale de NS4B et les quatre autres mutations sont localisées pour deux d'entre-elles dans les domaines I et II de NS5A et les deux dernières dans le domaine III de NS5A (Tellinghuisen et al, 2004). Toutes ces mutations réintroduites dans la chimère S1a-NS2-5A-1a2a-VPL (S1a/VPL/5A) conduisent à produire des particules infectieuses en culture cellulaire dont le titre viral est augmenté d'un facteur de 5 par rapport à la chimère S1a-NS2-1a2a-VPL (S1a/VPL), ce qui suggérerait un effet bénéfique de la protéine 5A de génotype 1a sur la formation et la sécrétion de particules virales infectieuses.

La première mutation identifiée et qui est située dans la partie C-terminale du domaine H2 de NS4B (Gouttenoire et al, 2009) concerne le changement d'une histidine vers une tyrosine en position 1961 (H1961Y). Cette histidine est conservée entre les génotypes 1a et 2a. La protéine NS4B est connue pour être impliquée dans la formation d'altérations des membranes cellulaires, appelées « membranous web » qui sont le lieu de la réplication virale. Des données récentes montrent que NS4B intervient, entre autre par le biais d'interaction avec NS5A, dans le cadre de la régulation de la réplication (Blight, 2011; Paul et al, 2011). De plus l'analyse de certaines mutations dans la partie C-terminale démontre que la protéine NS4B peut également influencer la production de particules virales (Jones et al, 2011; Paul et al, 2011). Une étude récente a montré que la modification de cette histidine vers une alanine (H1961A) améliore de façon significative la production de particules virales (Paul et al, 2011). Bien que la nature des aa soit différente, on peut penser que ce changement peut avoir des effets analogues. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été démontré que NS4B interagit avec NS5A (Dimitrova et al, 2003), et que les autres mutations sélectionnées dans notre étude sont toutes localisées au sein de NS5A. Le mécanisme exact d'interaction entre ces deux protéines virales n'est cependant pas encore connu. Nos données pourraient permettre de mieux appréhender ce type d'interaction dans de futures études.

Parmi les quatre mutations sélectionnées dans NS5A, la première est localisée au sein du domaine I (K2111T), elle touche une lysine largement conservée parmi tous les génotypes HCV que nous avons alignés. Ce premier domaine de NS5A est connu pour former une gouttière basique et se lier à l'ARN (Tellinghuisen et al, 2005). La seconde mutation touche un aa du domaine II (R2283Q), et permet de changer l'arginine spécifique à l'isolat que nous avons utilisé ici vers une glutamine qui est retrouvée dans la plupart des autres souches de

HCV. Le domaine II est connu pour être directement lié à l'activité de réplication du génome virale (Tellinghuisen et al, 2008b). Enfin les deux dernières mutations touchent des aa situés au niveau du domaine III de NS5A, la première touche un site potentiel de phosphorylation alors que la seconde touche une position peu conservée parmi les différents génotypes. Ce dernier domaine de NS5A est connu pour intervenir au niveau de l'assemblage des nouveaux virions (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008). Nous avons observé que l'insertion de la séquence NS5A de génotype 1a dans la chimère S1a-NS2-1a2a-VPL avait pour conséquence de diminuer le pouvoir réplcatif de la chimère par rapport à la chimère témoin. La réplication est partiellement restaurée avec les mutations YTQ mais totalement avec les mutations YTQPG. Par conséquent, les mutations sélectionnées dans les trois domaines de NS5A ont un effet sur la réplication de la chimère, et que l'accumulation des cinq mutations est nécessaire à la restauration complète de la réplication de la chimère. Il est important également de noter que la mutation K2111T, introduit un site potentiel de phosphorylation quand la mutation S2356P en fait disparaître un. La sérine en position 2356 ne semble pas jouer un rôle important dans l'assemblage des particules virales, comme c'est le cas pour certaines serine qui sont situées dans le domaine III de NS5A (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008; Tellinghuisen et al, 2008a). Cependant elle fait partie d'une des zones de phosphorylation basale de NS5A (Appel et al, 2005). Nous pourrions penser que la présence de la première mutation compenserait la perte d'un site de phosphorylation causée par la seconde.

Les deux dernières mutations interviennent quand à elle dans le domaine III de NS5A (Tellinghuisen et al, 2004). La fonction exacte de cette partie de la protéine n'est pas complètement caractérisée mais elle est connue pour intervenir dans l'assemblage des particules virales (Appel et al, 2008; Masaki et al, 2008). Les mutations que nous avons sélectionnées dans cette zone pourraient effectivement améliorer la production des particules virales chimériques, puisque nous observons une amélioration du titre virale. Toutefois le mécanisme qui régit ces changements pourrait impliquer plusieurs partenaires. En effet Appel et collaborateurs (Appel et al, 2008) ont montré que le domaine III de NS5A peut réguler l'activité d'assemblage des particules, par un processus qui reste à définir. De plus certaines études montrent que l'interaction entre le premier domaine hélicase de la protéine NS3 et la protéine NS5A peut améliorer la production de particules virales (Han et al, 2009). La construction de nos chimères intergénomiques a commencé avec l'introduction d'une mutation de la protéine NS3, et comme nous venons de le voir, nous avons sélectionné des mutations d'adaptation au sein de NS5A. Les résultats des études abordées plus haut, ainsi que les observations faites dans ce travail nous amène à penser que l'interaction entre ces

protéines nous amènerait à obtenir une meilleure production virale. L'ensemble des mutations d'adaptation que nous avons sélectionné pourrait améliorer ce processus.

E. Conclusions et perspectives

La souche JFH-1 (génotype 2a) de HCV est la seule à pouvoir être propagée efficacement en culture cellulaire. Les virus de génotype 1a ou 1b peuvent également être produits en culture cellulaire, mais l'infectiosité de ces virus reste faible (Pietschmann et al, 2009; Yi et al, 2006). Dans cette étude, nous avons cherché à construire et adapter une chimère intergénotypique 1a/2a de HCV. Notre construction n'a pu être propagée que grâce à la mutation Q1251L (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007), présente au sein de la protéine NS3, et nous avons pu sélectionner deux mutations d'adaptation qui améliorent l'efficacité de cette chimère au cours de 4 infections successives.

Nous n'avons pas pu clairement définir l'effet de ces deux mutations, aussi, une analyse plus approfondie pourrait nous permettre de prendre connaissance des mécanismes permettant cette adaptation de notre chimère. La protéine E2, complexée avec la protéine E1, intervient principalement au niveau de l'entrée des cellules. La mutation I262V pourrait avoir un effet direct sur cette étape par l'interaction de E1 soit avec les récepteurs cellulaires, soit avec la protéine E2 pour un meilleur repliement. Cette mutation pourrait aussi permettre une meilleure interaction entre le complexe de glycoprotéine et la capsid, au niveau de la formation des particules virales comme précédemment décrit (Lo et al, 1996).

La seconde mutation intervient dans NS2 et génère un motif inédit de trois prolines successives dans la protéine. Nous avons pu voir que NS2 possédait un rôle clé dans le cycle viral de HCV en interagissant avec de nombreuses protéines virales (Popescu et al, 2011; Stapleford & Lindenbach, 2011). Il pourrait être intéressant de suivre l'effet de l'insertion de la proline en position 862-864 sur l'interaction de NS2 avec les autres protéines virales. Cet effet peut se produire directement sur le processus de morphogénèse des particules virales, ou influencer sur NS5A, dans la mesure où NS2 peut réguler la phosphorylation de cette autre protéine virale (Liu et al, 1999). De plus, l'effet synergique existant entre les deux premières mutations que nous avons sélectionnées pourrait être un élément supplémentaire dans la compréhension de l'adaptation des virus chimériques, ce phénomène méritant des études plus avancées. Les données ainsi obtenue pourraient être confrontées aux résultats récemment publiés à ce sujet (Stapleford & Lindenbach, 2011).

Au cours de notre étude nous avons pu constater que la protéine NS3 jouait un rôle important dans l'adaptation de la chimère 1a/2a. Nous sommes parvenus à sélectionner une mutation d'adaptation ayant un effet analogue à celle décrite par Yi et collaborateur (Ma et al, 2008; Yi et al, 2007). La mutation Q1251L avait été décrite comme influençant la

morphogénèse des particules virales (Ma et al, 2008). De plus, d'autres études montrent que le premier domaine de la partie hélicase de NS3 permet de compenser un défaut au niveau de la protéine de capsid (Jones et al, 2011). Toutes ces observations nous portent à croire que cette zone précise de NS3 joue un rôle important dans la production des particules virales. Le mécanisme précis n'a cependant pas encore été défini. La recherche de celui-ci pourrait être le sujet d'une prochaine étude, et serait sans aucun doute riche en enseignement. En effet, les hélicases de plusieurs virus, y compris celles des *Flaviviridae*, sont connues pour intervenir au niveau de la production des particules virales infectieuses (Agapov et al, 2004; Jones et al, 2005; King et al, 2001; Taraporewala & Patton, 2004).

La seconde partie de notre étude nous a permis de construire et d'adapter pour la première fois une chimère intergénomique 1a/2a comportant la séquence codante complète de la protéine NS5A de génotype 1a. L'adaptation de cette nouvelle construction nous a amené à sélectionner de nombreuses mutations d'adaptation : une localisée dans NS4B à une position importante pour la production de particules virales (Jones et al, 2009; Paul et al, 2011), et les quatre autres présentes dans NS5A. L'analyse de ces mutations n'a été faite que pour deux groupes de mutants. Pour aller plus loin dans la caractérisation de ces mutations, il serait pertinent de pouvoir les analyser une à une.

L'ensemble des mutations que nous avons sélectionné dans cette seconde partie révèle sans doute un réglage assez fin de l'ensemble des interactions entre les différentes protéines virales, amenant à la production de particules virales. La réplication de la chimère possédant la séquence NS5A de génotype 1a avec l'ensemble des mutations d'adaptation est en effet similaire à celle de la chimère S1aVPL. Nous pouvons imaginer que certaines mutations vont perturber l'activité de NS5A sur un point, en même temps qu'elle améliore un autre point. Ainsi, l'ensemble des mutations est nécessaire pour équilibrer les différents changements dans cette protéine.

Enfin, l'introduction de la protéine NS5A de génotype 1a dans le contexte de notre chimère 1a/2a peut nous fournir un outil d'étude intéressant au niveau de cette protéine virale. Par ailleurs, la méthode utilisée ici pourrait être reproduite pour adapter étape par étape un génotype 1a complet à la culture cellulaire. Nous sommes en mesure de substituer, les séquences codant les protéines de génotype 2a restés dans la chimère 1a/2a, par leurs homologues de génotype 1a. En utilisant la même approche que dans cette étude, nous pourrions alors être en mesure de sélectionner les virus chimériques les mieux adaptés, jusqu'à obtenir un génome 1a complet. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de déterminer les facteurs permettant à une souche comme celle du JFH-1 de se propager en culture cellulaire,

contrairement aux autres. En définitive, ce type d'approche nous permettrait non seulement d'adapter un génotype 1a complet, mais également de nous donner des pistes pour comprendre comment propager d'autres souches en culture cellulaire.

F. Figures de la première partie

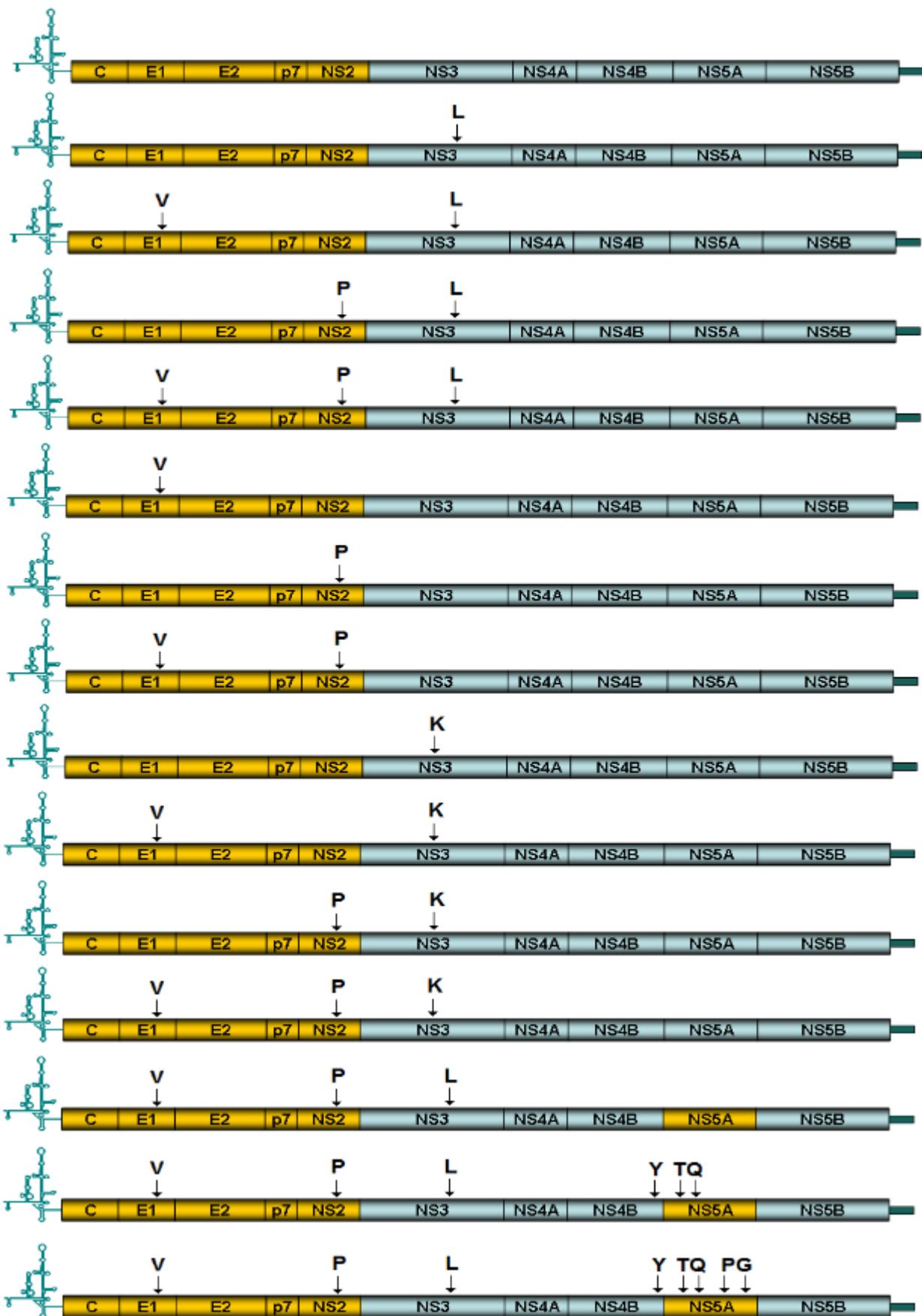


Figure 1 : Présentation des différentes chimères intergénomiques construites dans notre étude. Les séquences codant les protéines issues de génotype 1a sont représentées en jaune, et celles de génotype 2a en bleu. Les positions des mutations d'adaptation introduites sont indiquées par des flèches noires, et l'aa impliqué dans ces mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864 ; K pour Q1221K ; L pour Q1251L ; Y pour H1961Y ; T pour K2111T ; Q pour R2283Q ; P pour 2356P ; G pour D2416G.

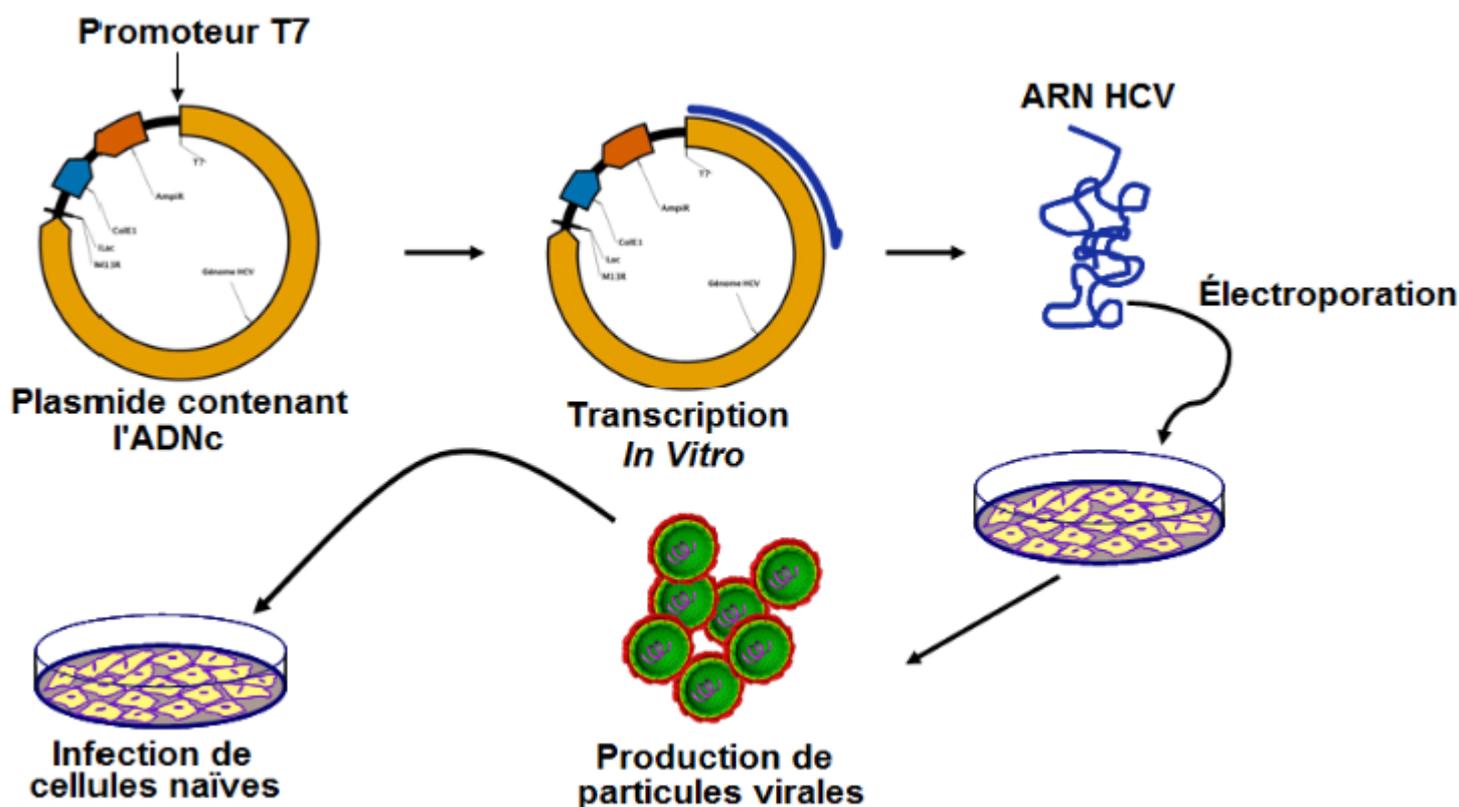


Figure 2 : Principe de production des HCVcc. L'ADNc du génome viral est placé sous la dépendance du promoteur du bactériophage T7 dans un plasmide pJFH-1, contenant un gène de résistance à l'ampiciline. Après linéarisation par l'enzyme de restriction XbaI, l'ADNc viral est transcrit en ARN par l'enzyme T7 RNA polymérase. Cet ARN sera alors électroporé au sein de cellules d'hépatocytes. Les cellules transfectées sont alors capables de produire des particules virales infectieuses et relarguées dans le surnageant de culture. Ce surnageant infectieux peut être utilisé pour infecter des cellules naïves à l'infection par HCV.

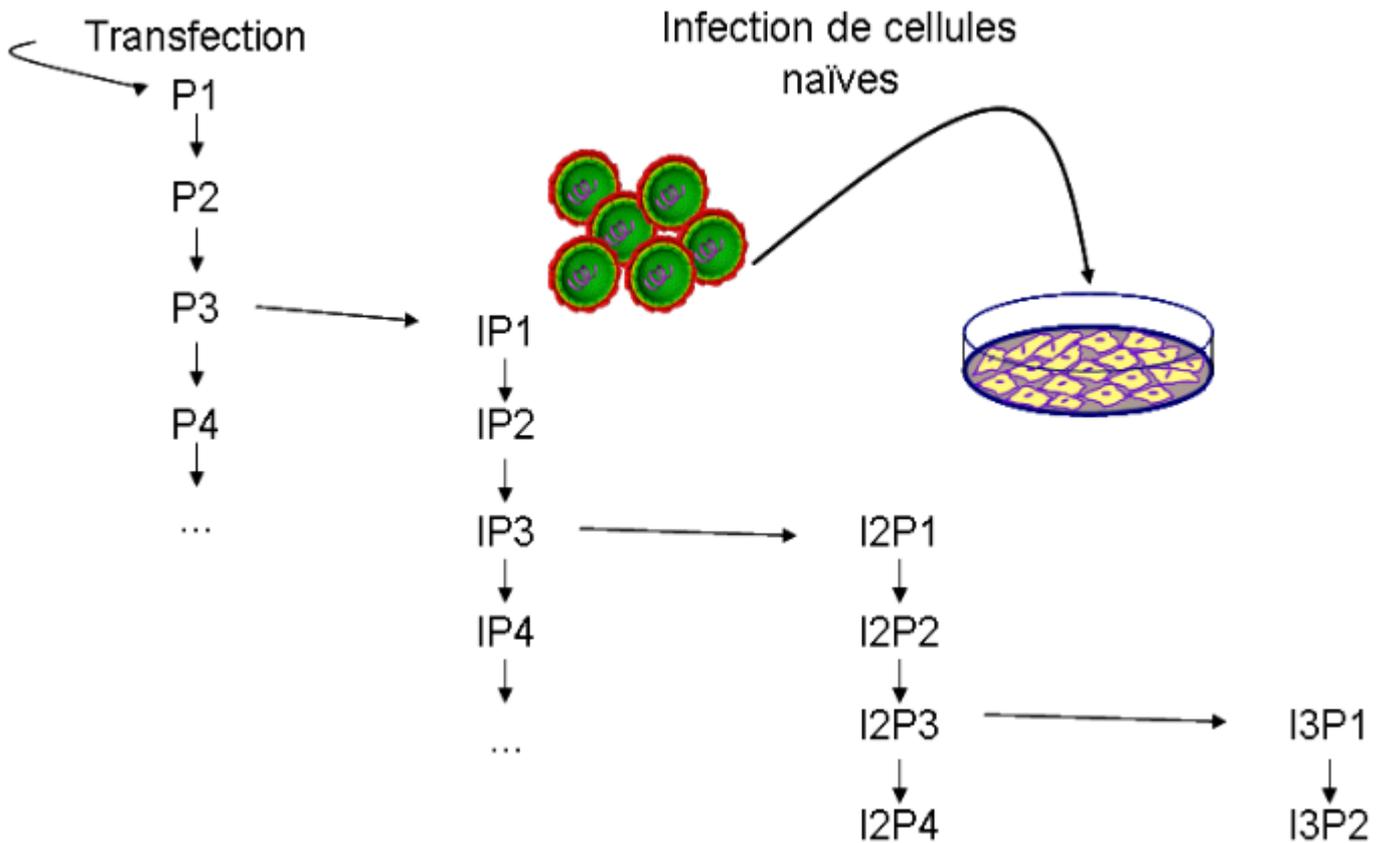


Figure 3 : Principe d'infection successive par HCV en culture cellulaire. Des cellules Huh-7 sont transfectées comme décrit dans la figure 2. Après 2 ou 3 passages, soit 10 à 14 j après infection, le surnageant infectieux est utilisé pour infecter des cellules naïves Huh-7. P correspond à un passage d'entretien des cellules, I correspond à une infection et le chiffre correspond aux nombres de passages ou d'infection.

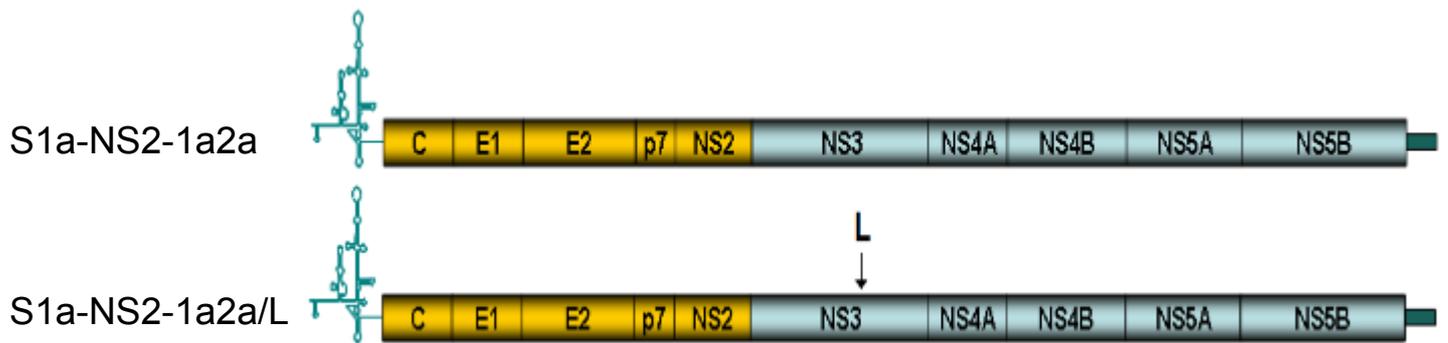
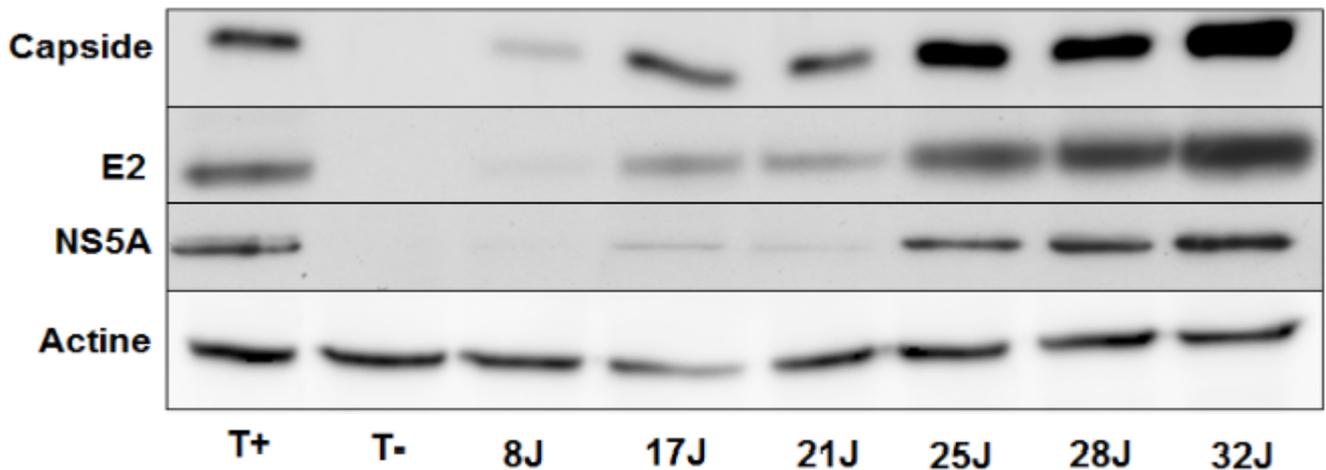
A**B**

Figure 4 : A- Représentation schématique des chimères S1a-NS2-1a2a et S1a-NS2-1a2a/L. Les séquences codant les protéines issues de génotype 1a sont représentées en jaune, et celles de génotype 2a en bleu. La position de la mutation d'adaptation introduite est indiquée par une flèche noire, l'aa impliqué dans cette mutation est annoté L pour Q1251L.

B- Résultat d'une analyse par immunoempreinte réalisé grâce à des lysats de cellules transfectées avec la chimère S1a-NS2-1a2a/L. Le jour de prélèvement des échantillons est indiqué en bas de chaque piste. T+ correspond à un lysat de cellules chroniquement infectées par le JFH-1, T- correspond à un lysat de cellules Huh-7 non infectées. Les résultats pour la capside, E2, NS5A et l'actine sont ici présentés.

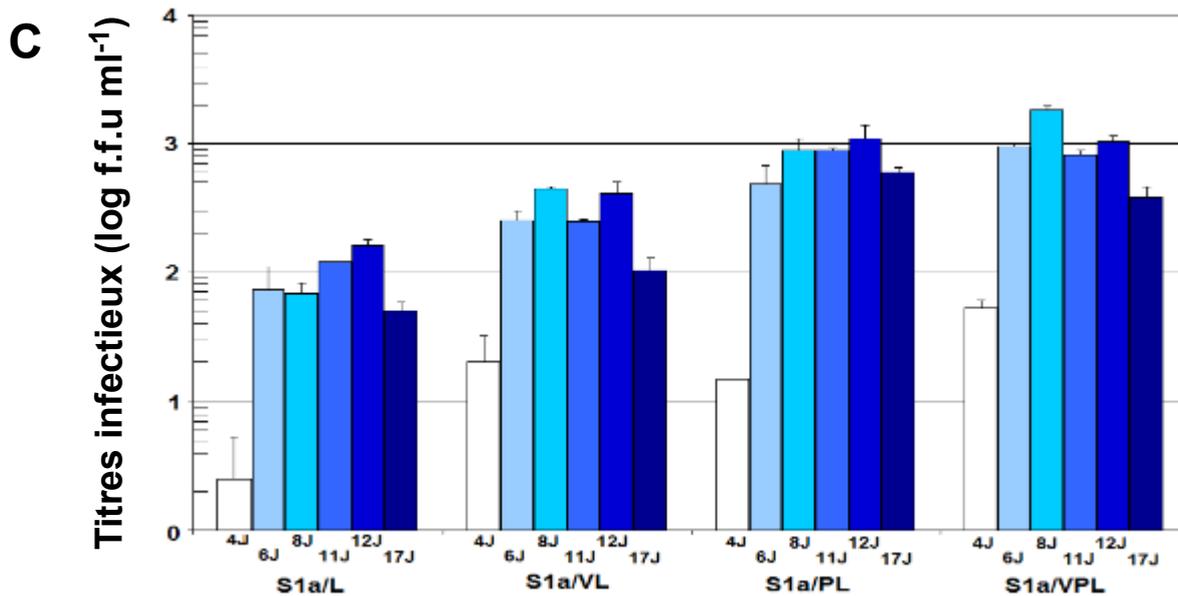
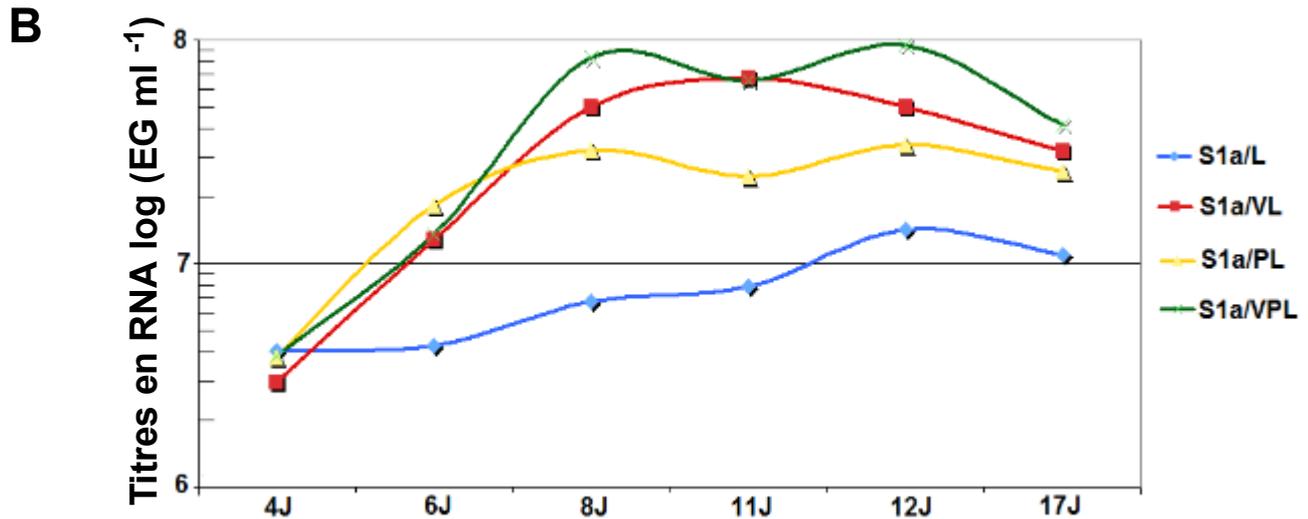
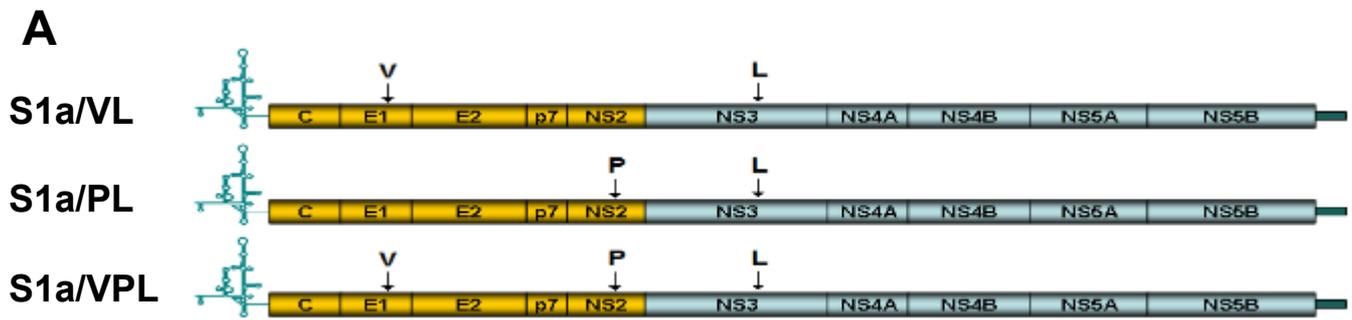
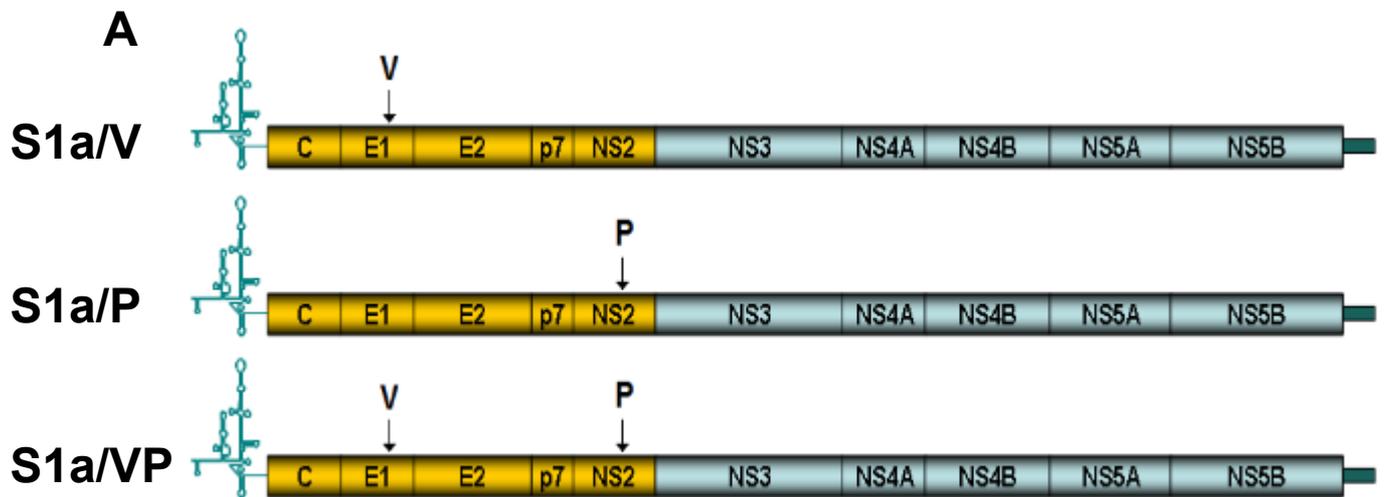


Figure 5 : A- Représentation schématique des chimères S1a/VL, S1a/PL et S1a/VPL. L'aa impliqué dans ces mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864 ; L pour Q1251L.

B- Détermination des équivalents génomes produits par les chimères S1a/L (Bleu), S1a/VL (Rouge), S1a/PL (Jaune) et S1a/VPL (Vert), sur une période de 17jours. Valeurs en équivalents génomes par ml (EG ml⁻¹)

C- Détermination des titres viraux des chimères S1a/L, S1a/VL, S1a/PL et S1a/VPL et regroupés par chimère. Valeurs en foyer formant unité par ml (f.f.u. ml⁻¹)



B

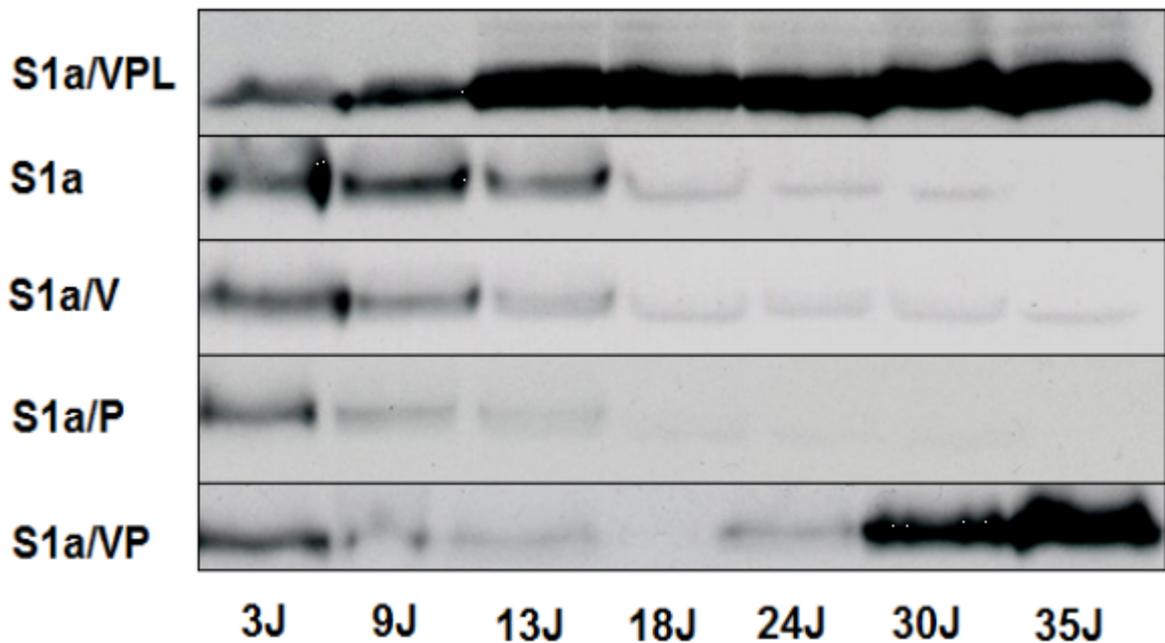


Figure 6 : A- Représentation schématique des chimères S1a-NS2-1a2a/V, S1a-NS2-1a2a/P et S1a-NS2-1a2a/VP. L'aa impliqué dans les mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864.

B- Résultat d'une analyse en immunoempreinte réalisée grâce à des lysats de cellules transfectées avec les chimères S1a/VPL, S1a, S1a/V, S1a/P et S1a/VP. Le jour de prélèvement des échantillons est indiqué en bas de chaque piste. Les résultats pour E2 sont ici présentés.

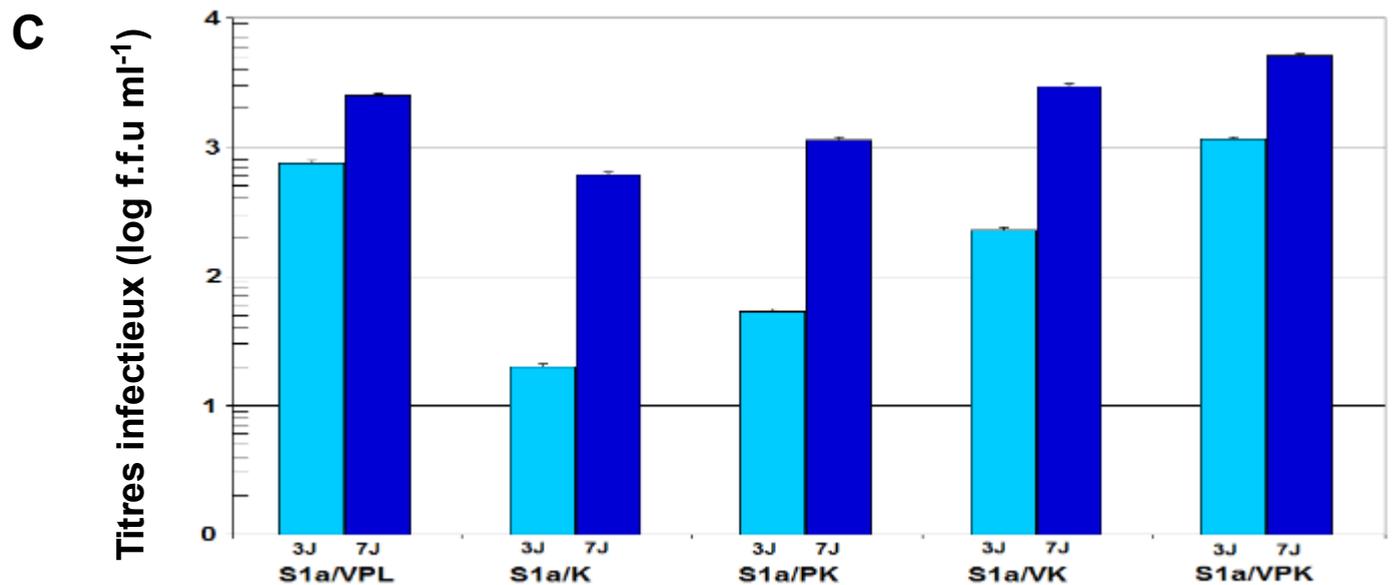
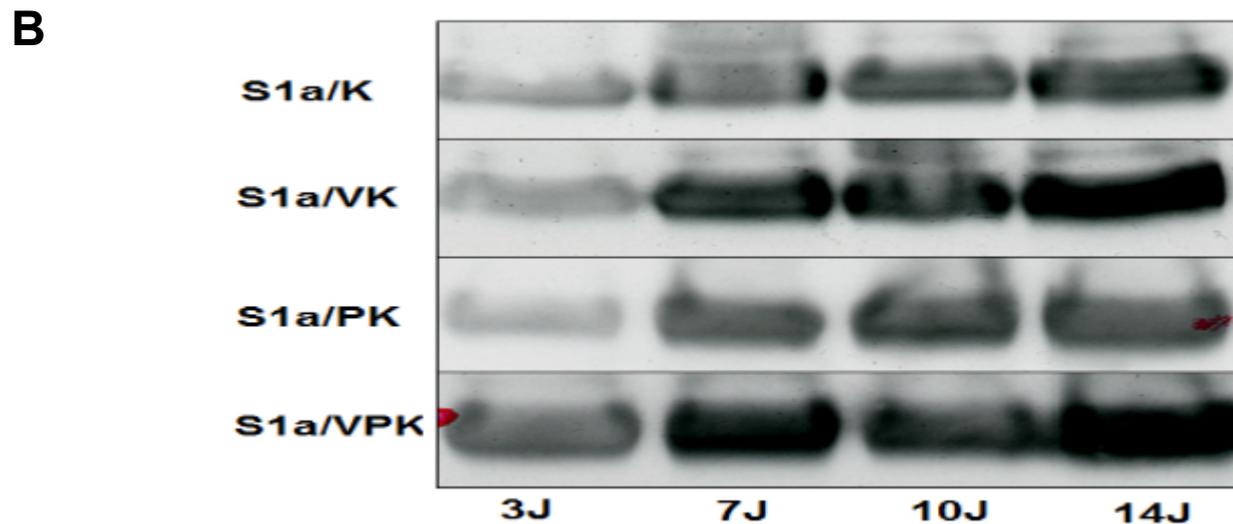
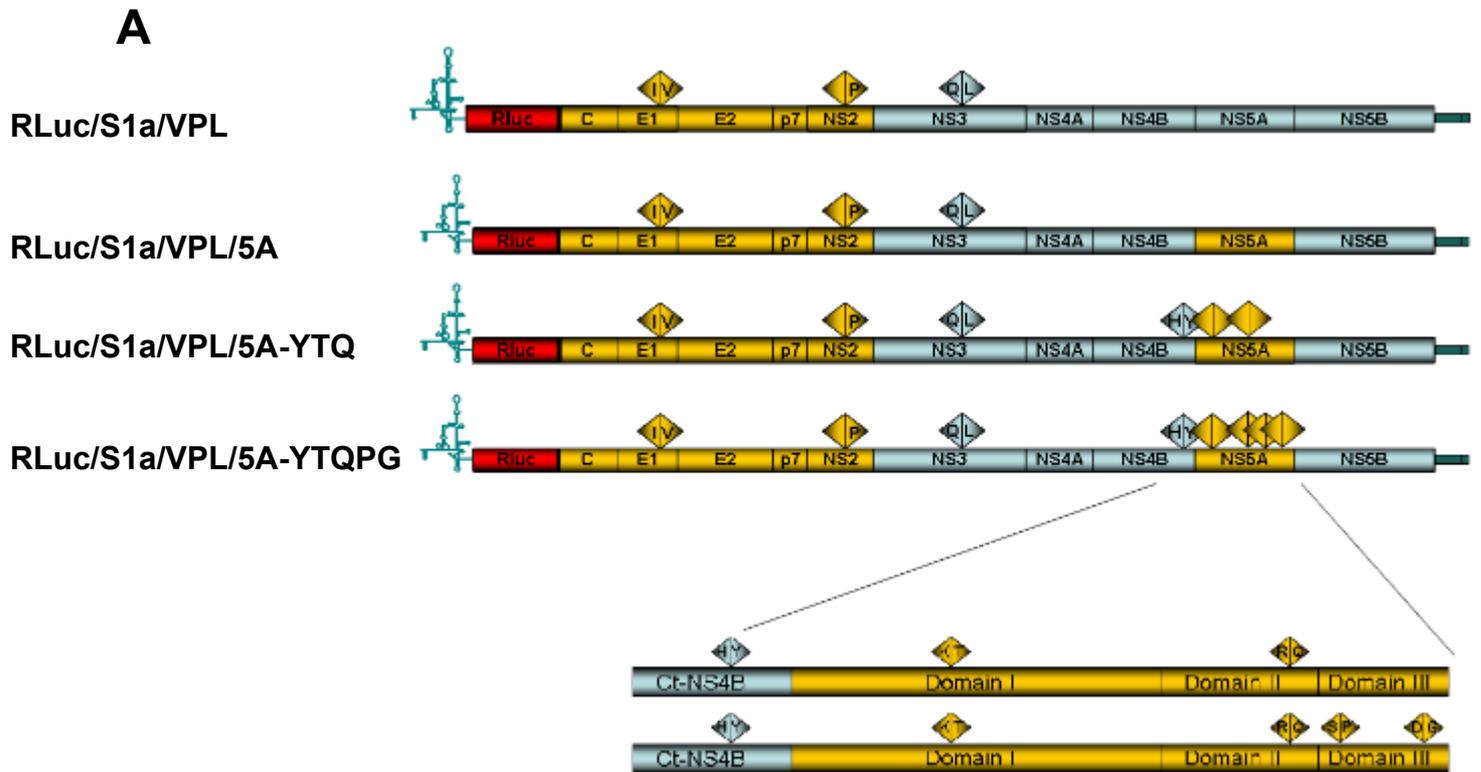


Figure 7: A- Représentation schématique des chimères S1a/K, S1a/VK, S1a/PK et S1a/VPK. L'aa impliqué dans les mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864, K pour Q1221K.

B- Résultat d'une analyse par immunoempreinte réalisée grâce à des lysats de cellules transfectées avec les chimères S1a/K, S1a/VK, S1a/PK et S1a/VPK. Le jour de prélèvement des échantillons est indiqué en bas de chaque piste. Les résultats pour E2 sont ici présentés.

C- Détermination des titres viraux produits par les chimères S1a/VPL, S1a/K, S1a/VK, S1a/PK et S1a/VPK, à 3 et 7 jours post-transfection. Les valeurs sont regroupées par chimère.



B

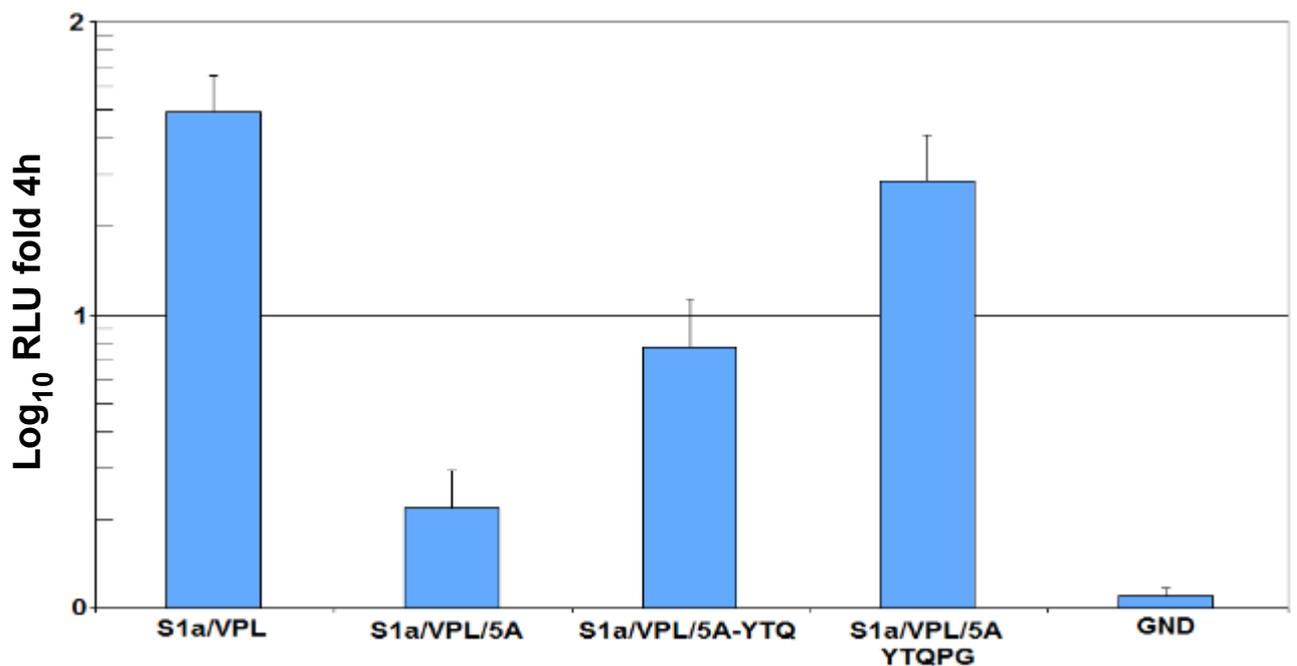


Figure 8: A- Représentation schématique des différentes chimères intergénomiques placées dans le contexte de la Rluc. L'aa impliqué dans les mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864 ; L pour Q1251L ; Y pour H1961Y ; T pour K2111T ; Q pour R2283Q ; P pour 2356P ; G pour D2416G.

B- Détermination de l'activité de réplication des chimères S1a/VPL, S1a/VPL/5A, S1a/VPL/5A-YTQ, S1a/VPL/5A-YTQPG et du mutant non répliquatif S1a/GND par lecture de l'activité de la Renilla *luciferase*. L'activité a été évaluée grâce à des lysats de cellules Huh-7w7 prélevé 72h post-électroporation. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'activité Renilla *luciferase* relevée pour les mêmes constructions à 4h post-électroporation.

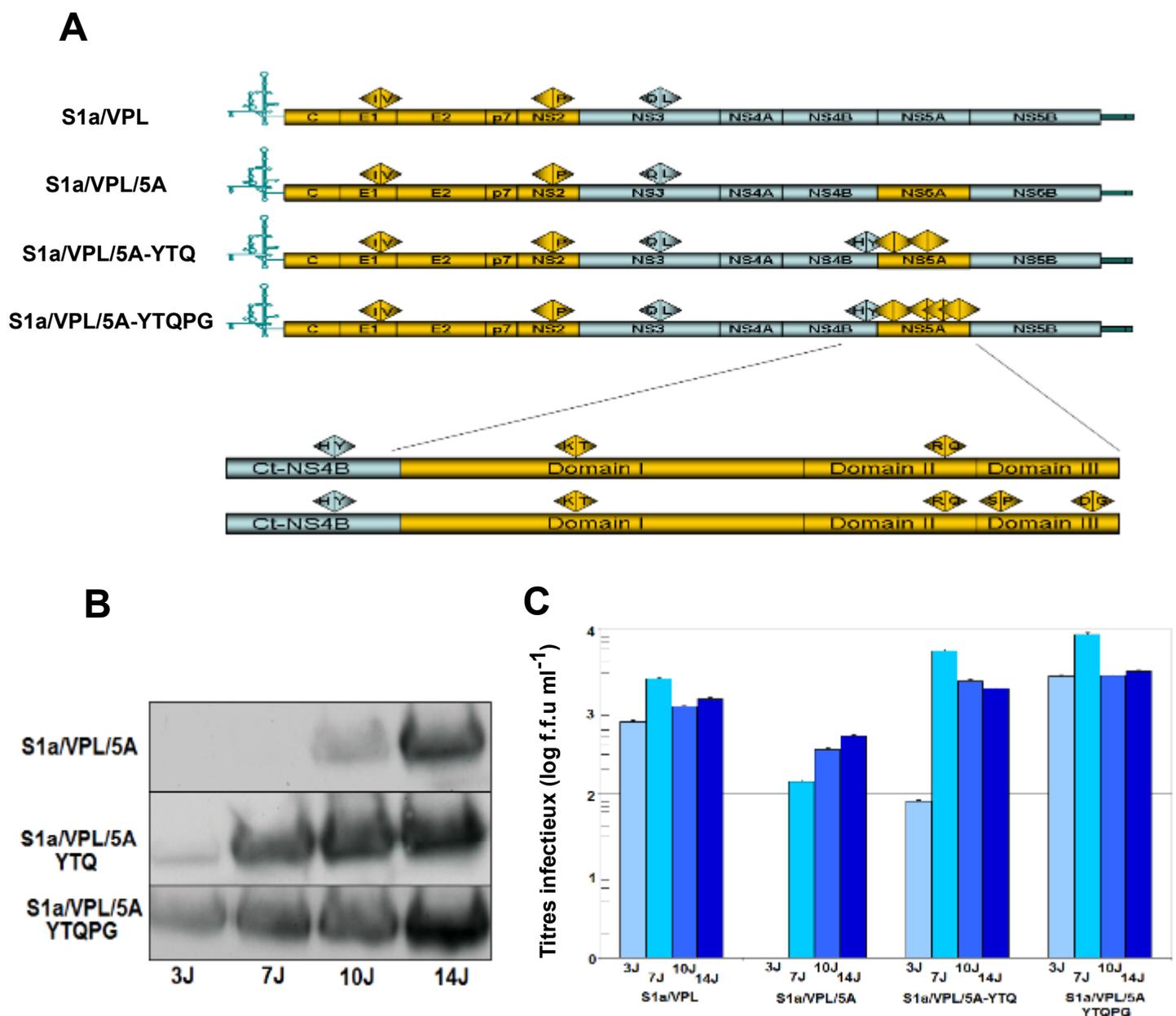


Figure 9: A- Représentation schématique des différentes chimères intergénomiques comportant l'insertion de la séquence codant la protéine NS5A de génotype 1a. Les séquences codant les protéines issues de génotype 1a sont représentées en jaune, et celle de génotype 2a en bleu. Un agrandissement de la fin de la protéine NS4B et de NS5A a été réalisé pour plus de précision. L'aa impliqué dans les mutations est précisé comme suit : V pour I262V ; P pour l'insertion de P en position 862-864 ; L pour Q1251L ; Y pour H1961Y ; T pour K2111T ; Q pour R2283Q ; P pour 2356P ; G pour D2416G.

B- Résultat d'une analyse par immunoempreinte réalisé grâce à des lysats de cellules transfectées avec les chimères S1a/VPL/5A, S1a/VPL/5A-YTQ et S1a/VPL/5A-YTQPG. Le jour de prélèvement des échantillons est indiqué en bas de chaque piste. Les résultats pour E2 sont ici présentés.

C- Détermination des titres viraux produits par les chimères S1a/VPL, S1a/VPL/5A, S1a/VPL/5A-YTQ et S1a/VPL/5A-YTQPG, à 3, 7, 10 et 14 jours post-transfection. Les valeurs sont regroupées par chimère.

IV. Résultats, second partie

A. Article I

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Hepatocyte-derived cultured cells with unusual cytoplasmic keratin-rich spheroid bodies^{☆,☆☆}

Pierre-Yves Delavalle^{a,b,c,1}, Khaled Alsaleh^{a,b,c,1}, André Pillez^{a,b,c}, Laurence Cocquerel^{a,b,c}, Cécile Allet^e, Patrick Dumont^{b,c,d}, Anne Loyens^e, Emmanuelle Leteurtre^f, M. Bishr Omary^g, Jean Dubuisson^{a,b,c}, Yves Rouillé^{a,b,c}, Czeslaw Wychowski^{a,b,c,*}

^aINSERM U1019, CNRS UMR 8204, CIIL, F-59021 Lille, France

^bUniversité Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

^cInstitut Pasteur de Lille, F-59019 Lille, France

^dCNRS UMR 8161, F-59021 Lille, France

^eINSERM U837-JPARC, 59045 Lille, France

^fService d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille, Avenue Oscar-Lambret, Lille cedex, France

^gDepartment of Molecular and Integrative Physiology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, United States of America

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 10 June 2011

Revised version received

22 August 2011

Accepted 24 August 2011

Available online 31 August 2011

Keywords:

K8

K18

Vimentin

HCV

Intracytoplasmic body

Malignant rhabdoid tumor

ABSTRACT

Cytoplasmic inclusions are found in a variety of diseases that are characteristic morphological features of several hepatic, muscular and neurodegenerative disorders. They display a predominantly filamentous ultrastructure that is also observed in malignant rhabdoid tumor (MRT). A cellular clone containing an intracytoplasmic body was isolated from hepatocyte cell culture, and in the present study we examined whether this body might be related or not to Mallory-Denk body (MDB), a well characterized intracytoplasmic inclusion, or whether this cellular clone was constituted by malignant rhabdoid tumor cells. The intracytoplasmic body was observed in electron microscopy (EM), confocal immunofluorescence microscopy and several proteins involved in the formation of its structure were identified. Using light microscopy, a spheroid body (SB) described as a single regular-shaped cytoplasmic body was observed in cells. During cytokinesis, the SB was disassembled and reassembled in a way to reconstitute a unique SB in each progeny cell. EM examination revealed that the SB was not surrounded by a limiting membrane. However, cytoplasmic filaments were concentrated in a whorled array. These proteins were identified as keratins 8 and 18 (K8/K18), which formed the central core of the SB surrounded by a vimentin cage-like structure. This structure was not related to Mallory-Denk body or aggresome since no aggregated proteins were located in SB.

[☆] Financial Support: This work was supported in part by grant from the « Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) » to YR and NIH grant DK52951 to MBO. PYD was supported by a predoctoral fellowship from MRT. KA was supported by a Syrian predoctoral fellowship. JD is an international scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

^{☆☆} Potential conflict of interest: Nothing to report.

* Corresponding author at: 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. Fax: +33 3 20 87 12 01.

E-mail address: czeslaw.wychowski@ibl.fr (C. Wychowski).

Abbreviations: MDB, Mallory-Denk body; SB, spheroid body, K8/K18, keratin 8 and keratin 18; IF, intermediate filament; MRT, malignant rhabdoid tumor; EGFP, enhanced green fluorescent protein; Rluc, *Renilla* luciferase; EM, electron microscopy; DIC, Differential Interference Contrast.

¹ Both authors contributed equally to this work.

Moreover, the structure of SB was not due to mutations in the primary sequence of K8/K18 and vimentin since no difference was observed in the mRNA sequence of their genes, isolated from Huh-7 and Huh-7w7.3 cells. These data suggested that cellular factor(s) could be responsible for the SB formation process. Aggregates of K18 were relocated in the SB when a mutant of K18 inducing disruption of K8/K18 IF network was expressed in the cellular clone. Furthermore, the INI1 protein, a remodeling-chromatin factor deficient in rhabdoid cells, which contain a spheroid perinuclear inclusion body, was found in our cellular clone. In conclusion, our data suggest that Huh-7w7.3 cells constitute an excellent model for determining the cellular factor(s) involved in the process of spheroid perinuclear body formation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Microtubules (MTs), microfilaments (MFs) and intermediate filaments (IFs) are the three major types of protein filaments, which compose the cytoskeletal network. Among these protein filaments, IFs encompass a large number of nuclear and cytoplasmic proteins expressed in a tissue- and differentiation-dependent manner [1,2]. The IF proteins are grouped into six types (types I–VI) and the types I–IV are found in the cytoplasm. The cytoskeletal IFs belong to a superfamily of about 73 unique gene products [3]. The predominant IF proteins of epithelial cells are the keratins (K), which are subdivided into type I (acidic, K9–K28, K31–K40) and type II (neutral to basic, K1–K8, K71–K86) subclasses [4,5] and include more than 50 gene products. IF proteins display a prototypical structure consisting of an α -helical central « rod » domain which is flanked by non α -helical NH₂-terminal « head » and Carboxy-terminal « tail » domains [1,6,7]. In epithelial cell type, IFs are composed of non-covalently linked heteropolymers of type I and II subunits. Differentiated hepatocytes are epithelial cells, and adult hepatocytes are unique since only K8 and K18, components of IFs of hepatocytes, are exclusively expressed in these cells [8] in a stoichiometric ratio 1 : 1 [9] and form obligate noncovalent heteropolymers into a cytoplasmic filamentous network.

Intracellular inclusions of IF proteins are associated with diseases of the liver, muscle or brain. One of the well-described hepatocellular cytoplasmic inclusion with abnormality of the keratin network is known as Mallory–Denk-bodies (MDBs) [10]. These structures result from the accumulation of misfolded or unfolded and aggregated keratin proteins and of non-keratin components as ubiquitin or heat shock proteins [10]. Usually, MDBs are observed as irregularly shaped, dense cytoplasmic inclusions of various sizes. Small MDBs are observed with IF bundles throughout the cytoplasm, while larger MDBs can be located in the perinuclear region [11,12]. Malignant rhabdoid tumors (MRTs), described originally as a renal malignant neoplasm of infancy and early childhood [13], have been characterized histologically by rhabdoid cells showing eosinophilic intracytoplasmic inclusions [13,14]. Furthermore, cytoplasmic inclusions of compact bundles or whorls of cytoplasmic filaments have been revealed by ultrastructural studies [14]. Later, MRTs with similar morphologic features have been reported for the liver [15,16]. The filaments of approximately 10 nm in diameter representing IFs have been characterized and immunohistochemical analyses have revealed an immunoreactivity for keratins. Furthermore, in most MRTs, the hSNF5/INI1 gene, acting as a tumor suppressor gene of MRT, has been reported to be inactivated by deletions and/or mutations [17–19].

In the present study, we have isolated a cellular hepatocytic clone (Huh-7w7.3 cells) containing an intracytoplasmic keratin-rich body, which appears as a single and regular shaped body in the cell. Surprisingly, this spheroid body (SB) is disassembled before division and reassembled after cell division as a unique SB per cell.

Materials and methods

Hepatic cell line cultures and reagents

Human hepatoma Huh-7 and related cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium as previously described [20]. Huh-7w7/CD81⁻ cells [21], which are resistant to hepatitis C virus (HCV) infection, were transfected with plasmid expressing EGFP. The Huh-7w7.3 cells, presenting a cytoplasmic inclusion, were selected as a subpopulation of Huh-7w7 cells. Huh-7w7.3 cells expressing CD81 were obtained by stable transfection with pcDNA3.1/CD81 [22] as described previously [23].

DNA transfection

Briefly, trypsinized cells were washed with DMEM medium and then resuspended at 10×10^6 cells/ml with Opti-MEM (Invitrogen). 400 μ l of cell suspension were mixed with 5 μ g of recombinant DNA and transferred to an electroporation cuvette. The cells were pulsed at 280 V and 960 μ F with the Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) [20]. Transfected cells were then transferred in DMEM 10% SVF and seeded at 3×10^4 /well in a 24 well plate containing coverslips or transferred to 10-cm culture dishes containing culture medium. For indirect immunofluorescence, the cells were washed with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde three days after electroporation, and for the selection G418 (1.0 mg/ml) was added to the culture medium at 24 hours after transfection. Culture medium supplemented with G418 was replaced twice a week until the selection of individual cellular clones.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequencing

Primers were designed to cover all sequences of the keratin 8 mRNA gene (GenBank Accession N°. AAA35748), keratin 18 mRNA gene (GenBank Accession N°BC000180.2) and vimentin mRNA gene (N°M14144.1). Total RNA was extracted from Huh-7 and Huh-7w7.3 cells using TRI Reagent (Sigma). Reverse transcription was performed with the Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to

the manufacturer's protocol and the PCR was performed by Expand High Fidelity PCR System (Roche). After purification, direct sequencing was carried out by the dideoxy chain termination methods using a Perkin Elmer ABI Prism sequence analyzer (Applied Biosystems). No difference was observed in the mRNA of these different genes as compared between Huh-7 and Huh-7w7.3 cells.

Electron microscopy

For ultrastructural analysis, cells were grown at 37 °C in a CO₂ incubator and then fixed on Corning tissue culture dishes with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h. Cells were then washed in phosphate buffer, harvested and postfixed with 1% osmium tetroxide (OsO₄) for 1 h. They were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon resin. Ultrathin sections (90 nm thick) were cut on an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung), collected on parlodion-coated nickel grids and stained successively with 2% uranyl acetate and with lead citrate. The grids were finally analyzed with a transmission electron microscope (Zeiss EM902, Germany) equipped with a Orius camera interface. Pictures were taken at a resolution of 8 million pixels with Digital Micrograph software (Gatan, France).

Indirect immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were grown on glass coverslips in growth medium and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) during 20 min at room temperature. After washing with PBS solution, the fixed cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS. Immunostaining with primary antibodies to K8 (Ks 8.7, Progen Biotechnik GmbH), K18 (Calbiochem, mAb (DC-10), vimentin (Dako, clone V9; abcam: mAb Vim3B4), β -tubulin (Sigma), p62 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Hsp90 (Sigma-Aldrich GmbH), INI1 (Sigma-Aldrich GmbH), HCV capsid protein (ACAP27) [24], HCV E2 glycoprotein (3/11) [25] and hCD81 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) were detected with Alexa 488 or Alexa 555- conjugated goat antibodies to mouse or rat IgG (Invitrogen). For double-label immunofluorescence with anti-C mAb ACAP27 (IgG2a) and another mouse mAb (IgG1) isotype-specific Alexa 555-conjugated goat anti-mouse IgG2a and Alexa 448 conjugated goat anti-mouse IgG1 were used. Coverslips were then mounted on glass slides using Moviol 4–88 (Calbiochem) and observed with a Zeiss Axioplan 2 axiophot. Confocal microscopy was performed with a 710 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a 63x/1.4 numerical aperture oil immersion lens. Double-label immunofluorescence signals were sequentially collected by using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. The 4–6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 mg/ml) was used for nuclei staining. Images were processed by using Adobe Photoshop or canvas softwares.

Flow cytometry

For CD81 staining, cells were rinsed with PBS containing PBS-2% BSA and detached with PBS-2 mM EDTA and incubated for 1 h at 4 °C with anti-human CD81 (1.3.3.22) mAb as described previously [21]. Cells were then incubated with phycoerythrin (PE) labeled goat anti-mouse for 45 min at 4 °C and fixed with formalin solution (PFA 4%, Sigma). Cells stained only with secondary antibodies

were used as negative control. Labelled cells were analyzed by using a Beckman EPICS-XL MCL. For side scatter and forward scatter analyses, cells were rinsed with PBS containing PBS-2% BSA, detached with PBS-2 mM EDTA and analyzed as described.

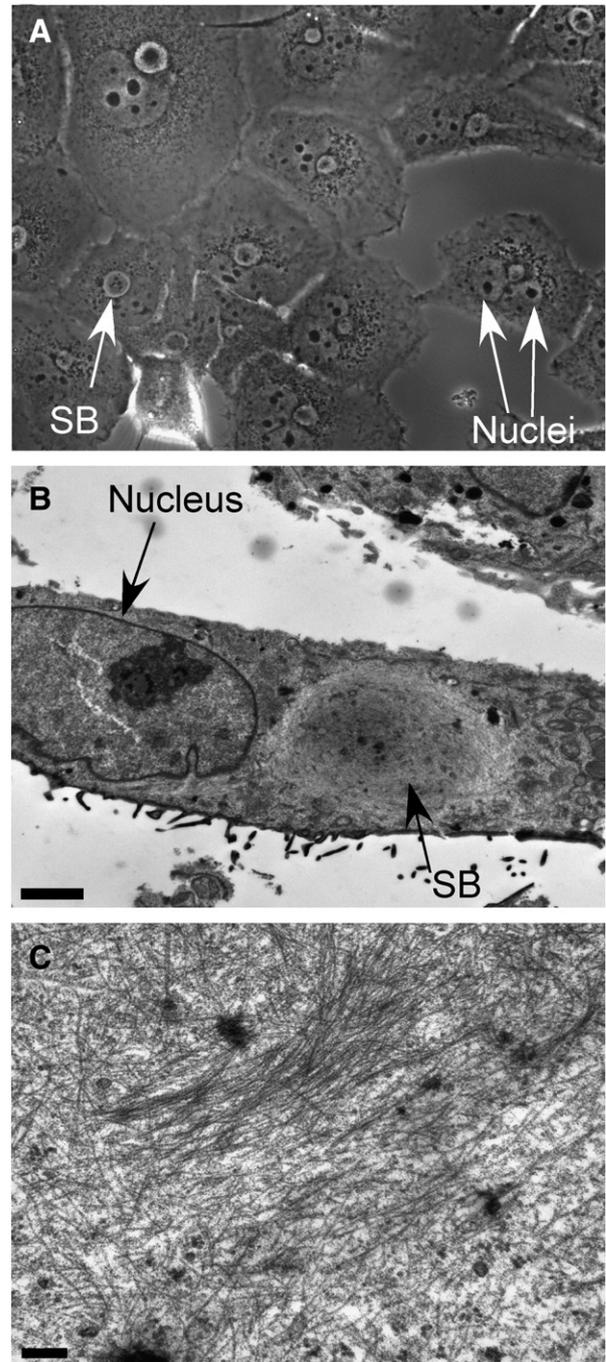


Fig. 1 – Light and electron microscopy of ultrathin sections of Huh-7w7.3 cells presenting SB. A- Light microscopy of intracellular inclusion showing the form of a SB closed to the nucleus of Huh-7w7.3 cells. More than one nucleus is also observed in some Huh-7w7.3 cells. B- Ultrastructure of Huh-7w7.3 cells showing a aggregation of whorls of filament proteins. Cytoplasmic body noted SB and Nucleus (N), bar 2 μ m. C- A High-magnification image showing the filaments observed in the SB, bar 200 nm.

Western blot analysis

Cells were lysed either in a buffer containing 50 mM Tris/ HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% (v/v) Igepal and a mixture of protease inhibitors (Complete, Roche) [20] or in a buffer lysis containing 1% Empigen BB (Calbiochem) in PBS (pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF and a mixture of protease inhibitors [26]. Proteins of pre-cleared cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham) by using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad) and revealed with a specific mAb followed by goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Jackson ImmunoResearch). The immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence detection (ECL : Amersham) as recommended by the manufacturer.

Production of HCV and infection assays

Production of HCV [20,27] and infection assays with HCV expressing Rluc were performed as previously described [23].

Results

Isolation of a cellular clone displaying a large SB in its cytosol

In a previous study, we described a human hepatoma Huh-7 cell clone (Huh-7w7), which is resistant to hepatitis C virus (HCV) infection [21]. This cellular clone has lost CD81 expression,

which is an essential HCV entry factor [28]. In the context of further analysis, Huh-7w7 cells were transfected with a plasmid expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) and the selectable marker neomycin to generate Huh-7w7 cells constitutively expressing EGFP. Due to the heterogeneity of EGFP expression, limiting dilution was performed on cellular clones to select the best one for EGFP expression. Surprisingly, among the different clones generated, several of them were selected as morphologically different from others due to the presence of a single regular-shaped cytoplasmic body per cell representing a spheroid body (SB) (Fig. 1A). The study was focused on one of them. The body was easily observed in all cells by light microscopy without any specific labelling. This cellular clone was named Huh-7w7.3. As defined by flow cytometry analysis, no drastic change in cell size (FS) and granularity (SS) was observed (see supplementary data, Fig. S1) as for doubling time of these cells. The EGFP expression was detectable by flow cytometry but undetectable by fluorescence microscopy (data not shown) which was convenient for further immunofluorescence analysis. The SB formed in cultured Huh-7w7.3 cells was always localized adjacent to the nucleus of which the morphology was sometimes distorted by the presence of the SB (Fig. 1A). In some cases, the body displayed extensions into the cell cytoplasm, which appeared to surround the nucleus. Analyzed by electron microscopy (EM), this body had no limiting membrane and was easily distinguished from other organelles. In general, cytoplasmic filaments were concentrated in whorled arrays (Fig. 1B) and a higher magnification of these filaments was presented (Fig. 1C). Finally, EM did not reveal any apoptotic features in the cytoplasmic body-containing cells.

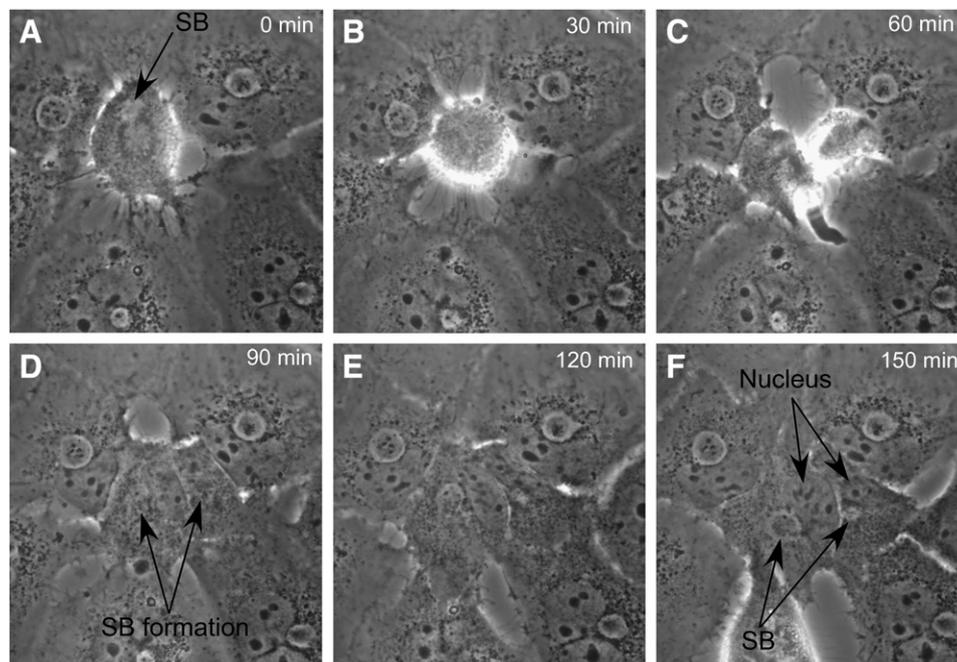


Fig. 2 – Live cell imaging microscopy of Huh-7w7.3 cells. Cells were plated on a glass bottom dish (WillCo-Dish®) and incubated overnight at 37 °C. Cell images were next acquired with a MRm camera on an AxioObserver Z1 microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Inc) and were controlled by Axiovision software. Cells maintained at 37 °C under 5% CO₂ were monitored for 18 hours at 1 frame/120 seconds. Some pictures were selected at different times during the mitosis of a cell (see the Fig. S2 mov for more details). Disruption and reassembly of SB were visualized. The time was calculated from the first picture (A, 0 min) and the last picture (F, 150 min). (A-B) represent metaphase, anaphase (C) telophase and (D, E and F) cytokinesis.

Live cell imaging of SB during cell division

Since the SB was distinctly observed in each cell, we next wanted to examine the dynamics of the formation of this structure during cell division. For this purpose Huh-7w7.3 cells were observed by time-lapse videomicroscopy in phase contrast. Light micrographs were taken every 2 min. A selection of these pictures are presented in Fig. 2 (see supplementary data, Fig. S2. mov). At the beginning of the prophase, we observed that the SB was still present in its original form, but before cell division the structure seemed to become totally disorganized. However, just after cell division the SB was reassembled mostly at the same time as the cell nucleus, with only one single body per cell (Fig. 2F). Altogether these data showed that this type of body formation was unique among cytoplasmic inclusions and followed a reassembling process leading to a single body per cell.

The lack of CD81 and the integration of a transgene into cellular genomic DNA are not responsible for the presence of SB

We next wondered whether the absence of CD81 expression could be responsible for the presence of the SB within the cell. For this, we ectopically expressed CD81 in Huh-7w7.3 cells and CD81 expression levels were next controlled by flow cytometry analysis. As shown in Fig. 3A, the CD81 expression level in Huh-7w7.3 cells was close to the background level whereas in transfected cells (Huh-7w7.3/CD81 cells) its expression was notably increased. Huh-7 cells were used as a positive control for CD81 expression. It has to be noted that all cell lines displayed similar expression of the control tetraspanin CD151 (data not shown). As shown in Fig. 3B, CD81 expression in Huh-7w7.3/CD81 cells did not prevent the formation of SB. The permissivity of Huh-7w7.3 cells to HCV infection was next tested using a recombinant virus expressing the Renilla luciferase reporter gene (Rluc) [23]. As shown in Fig. 3C, Rluc activity was only detected in cells expressing CD81 (Huh-7 and Huh-7w7.3/CD81) and not in CD81-deficient cells (Huh-7w7.3). Thus, these data indicate that SB do not interfere with the infection and replication of HCV.

Finally, we wanted to assess whether the selection of cells presenting a SB was due to an integration of plasmid DNA into cellular genomic DNA or due to the selection of cells already present in Huh-7w7 cell population. The untransfected Huh-7w7 cells were submitted to a new limiting dilution and individual clones were selected. Many of these clones displayed similar characteristics to Huh-7w7.3 cells (data not shown). Thus, it appeared that the SB is a intrinsic feature of the selected cellular clone, and not a consequence of plasmid integration into cell genome.

K8, K18 and vimentin are components of the SB

Since K8 and K18, the unique keratins expressed in differentiated hepatocytes [8], are components of IFs of hepatocytes, we wondered whether the SBs could be constituted by these proteins. The visualization of SB with K18 immunostaining in Huh-7w7.3 cells (as well as K8, data not shown) indicated that K18 (and K8) was mainly redistributed within the SB (Figs. 4A-B). In confocal analysis, immunostaining of K18 in Huh-7 cells displayed a thin intracellular network (Fig. 4C) whereas K18 was mainly whorled in cytoplasm of Huh-7w7.3 cells (Fig. 4D). Immunostaining of K18 was brighter in all SBs. DAPI staining revealed that cell nuclei

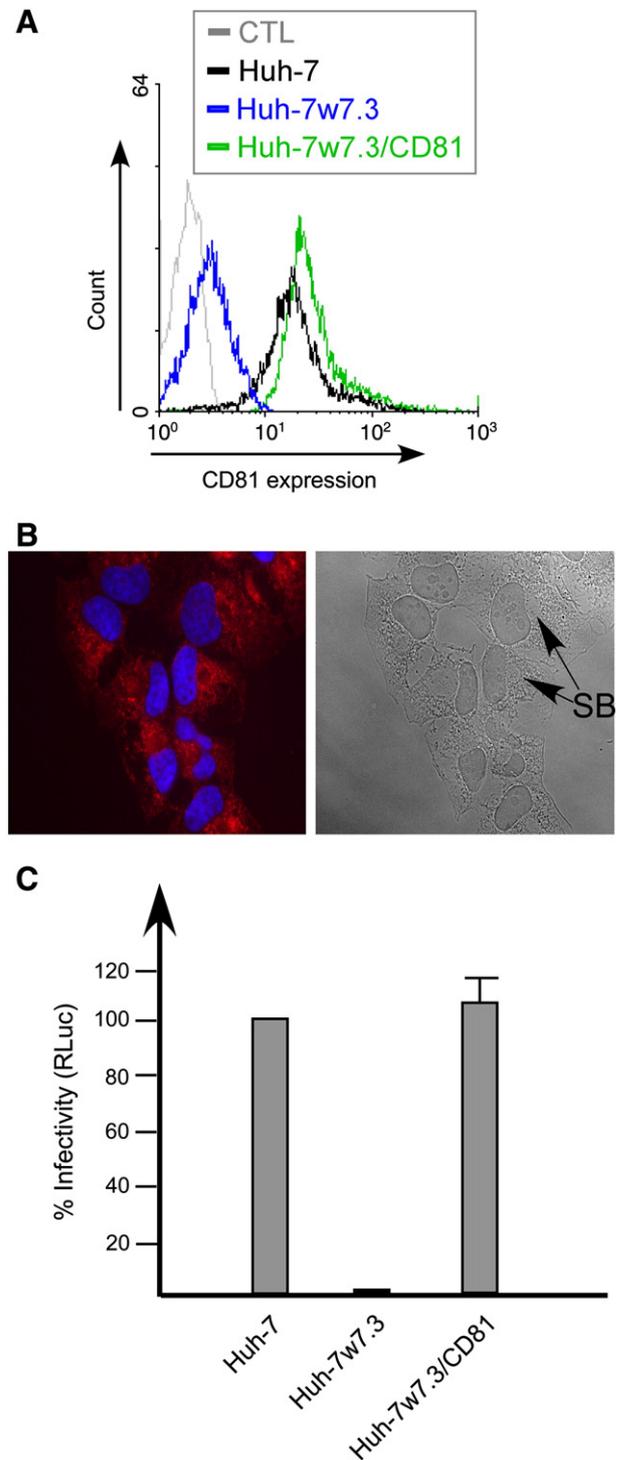


Fig. 3 – Analysis of Huh-7w7.3 and Huh-7w7.3/CD81 cells. Huh-7 and derived cells were analyzed by A- Flow cytometry analysis of CD81 cell surface expression. Cells were stained using an anti-hCD81 (1.3.3.22) and secondary antibodies conjugated to phycoerythrin (PE). Control corresponds to Huh-7 cells stained with secondary antibodies. B- Huh-7w7.3/CD81 cells were processed for immunofluorescence for hCD81 (red) and nuclei (DAPI) (blue). A DIC (Differential Interference Contrast) image of the same cells shows the presence of SBs. C- Cells were infected with HCV expressing Rluc. Results are presented as relative percentages to HCV infectivity in Huh-7 cells.

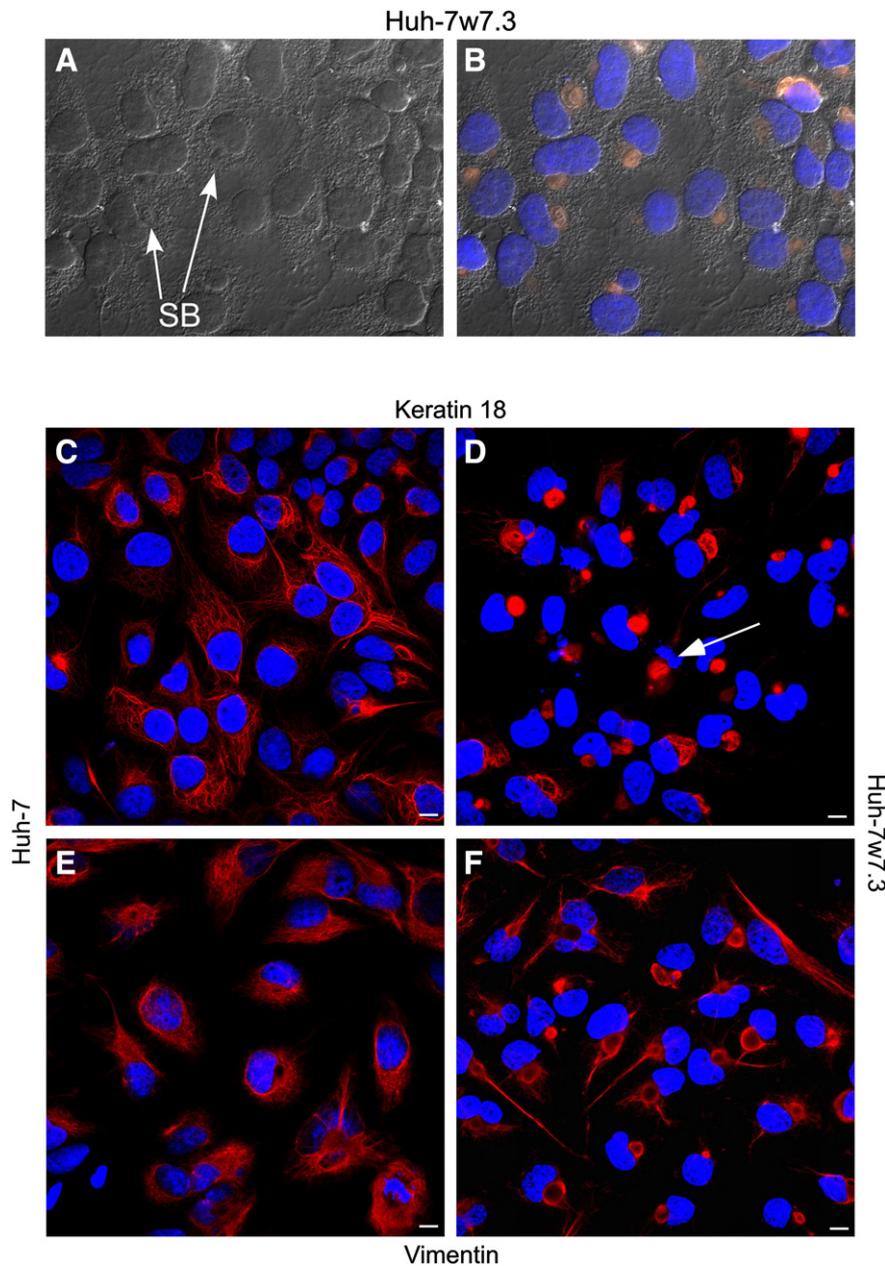


Fig. 4 – Colocalization of K18 with SB and immunofluorescence analysis of K18 and vimentin intracellular distribution in Huh-7 and Huh-7w7.3 cells. A- DIC image of Huh-7w7.3 cells with SB (arrows). B- Overlap of the image shown in A with the immunofluorescent detection of K18 (orange) and nuclei (DAPI, blue). Note that K18 is localized in SB. Huh-7 (C, E) and Huh-7w7.3 cells (D, F) were immunostained with antibodies to K18 (C, D) or vimentin (E, F). Nuclei in all cases were immunostained with DAPI. K18 and vimentin are shown in red. Whole cell distribution of the proteins is shown using maximal intensity projections of confocal Z-stacks. White arrow indicates a cell in metaphase. Bar, 10 μ m.

appeared more distorted in presence of SB and more than one nucleus were sometimes observed in cells. Immunostaining of vimentin in Huh-7w7.3 cells was also performed. As shown in Fig. 4E, vimentin was extended through Huh-7 cells whereas it was redistributed in Huh-7w7.3 cells (Fig. 4F). The vimentin seemed to be recruited around the SB since this one presented a brighter ring around the body than in the center of it. The possibility that the vimentin formed a cage-like structure was confirmed by a double immunostaining of K18 and vimentin (Fig. 5). The distribution

of actin microfilaments using phalloidin and of microtubules using an anti β -tubulin antibody was also analyzed. However, no significant modifications were observed concerning the localization of these proteins in Huh-7w7.3 as compared to Huh-7 cells (see supplementary data, Fig. S3). To visualise different steps of the assembly/disassembly of the SB during the mitosis, microscopic images were also selected during the confocal laser scanning and presented as supplemental data (Fig. S4). Consequently, our observations indicate that K8, K18 and vimentin have been displaced

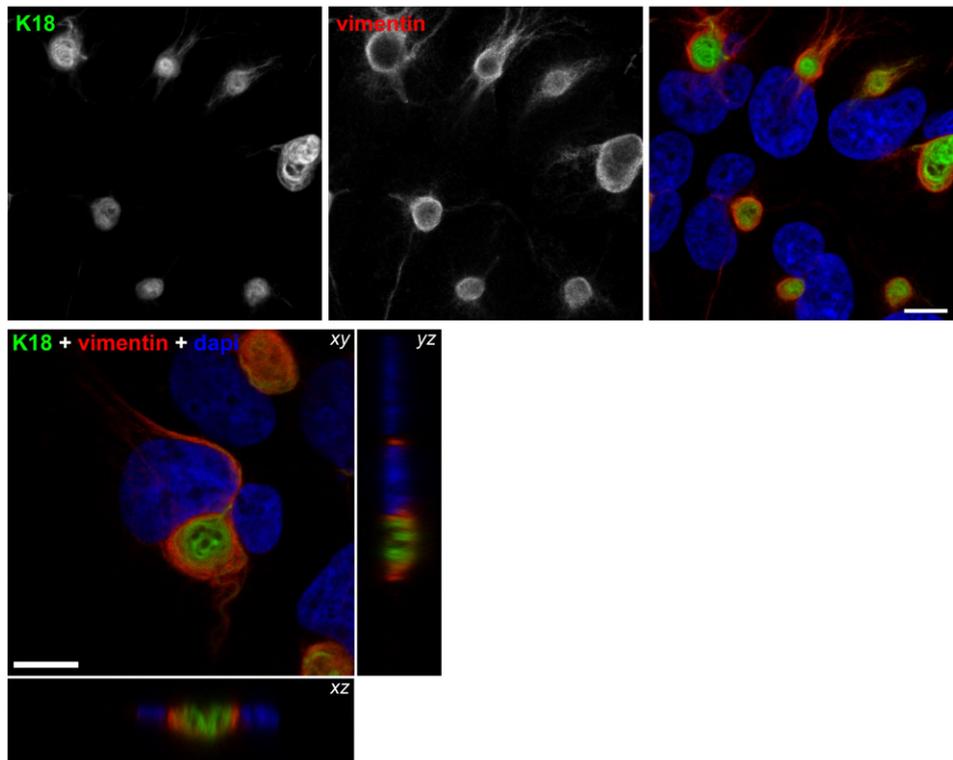


Fig. 5 – Characterization of a cage-like structure of vimentin by double immunostaining. Huh-7w7.3 cells were immunostained with antibodies to K18 (green) and vimentin (red) to observe the endogenous intermediate filaments. Images were acquired by confocal laser scanning. Nuclei were immunostained with DAPI. A merged version is shown. Axis yz and xz have shown and the pictures acquired in confocal indicate that the keratin (green) is surrounded by vimentin (red). Bar, 10 μm .

from their normal cellular localization and are involved in SB structure in Huh-7w7.3 cells.

SBs are not related to MDBs

Former studies have described MDBs as keratin-rich inclusion bodies containing cellular components involved in protein degradation such as p62 and poly-ubiquitin [29,30] and heat shock proteins such as Hsp25, Hsp70 and Hsp90 [31,32] involved in the rescue or elimination of denatured and aggregated proteins. We therefore examined whether the SB present in Huh-7w7.3 cell shared some of these characteristics with MDB. Immunostaining of Huh-7 and Huh-7w7.3 cells with antibodies directed against p62 and Hsp90 revealed that none of these proteins were recruited to the SB (see supplementary data, Fig. S5 for p62 staining and Fig. S6 for Hsp90 staining). Moreover, immunoblotting analysis for K8 and K18 indicated that the formation of SB could not result from an imbalance of K8/ K18 ratio (Fig. 6A) as described for the formation of MDBs [33,34]. These data indicated that the SB did not contain aggregated proteins and this structure was not related to MDB.

The primary sequence of K8, K18 and vimentin is not involved in the SB formation

Since K8, K18 and vimentin formed the SB, we asked whether the resulting structure could be due to the presence of mutations in these proteins or in one of these proteins. Primers were designed

to cover all sequences of K8, K18 and vimentin mRNA. The total cellular RNA from Huh-7 and Huh-7w7.3 cells was reverse transcribed, amplified by PCR and the resulting DNAs were then sequenced. No difference was observed in the mRNA of these different genes, isolated from Huh-7 and Huh-7w7.3 cells, suggesting that the primary sequence of K8, K18 and vimentin was not responsible for the SB formation. To confirm this data, Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were transfected with the green fluorescent protein (GFP)-wt-K18 expressing plasmid [35]. As shown in the Fig. 7, only GFP-K18 transfected Huh-7w7.3 cells revealed typical cytoplasmic whorls of IFs. These data confirm that the formation of SB is not dependent on the primary structure of IF proteins and the formation of SB is probably induced by a cellular determinant present in Huh-7w7.3 and not in Huh-7 cell.

The Huh-7w7.3 cell does not share the characteristics of a rhabdoid tumor cell

Since MRT and Huh-7w7.3 cells present cytoplasmic inclusions with whorls of IFs, we wanted to determine whether Huh-7w7.3 cells might also be defective in INI1 expression, a remodeling-chromatin factor, as observed in MRT [17,36]. To assess INI1 expression, immunostaining and western blotting assays were performed on Huh-7 and Huh-7w7.3 cells by using a mouse monoclonal anti-INI1/SNF5. In both assays, INI1 expression was detected (Fig. 6). A product of about 44 kDa was detected by immunoblotting of cellular extracts (Fig. 6A) and nuclear location of INI1 expression was observed by indirect immunofluorescence

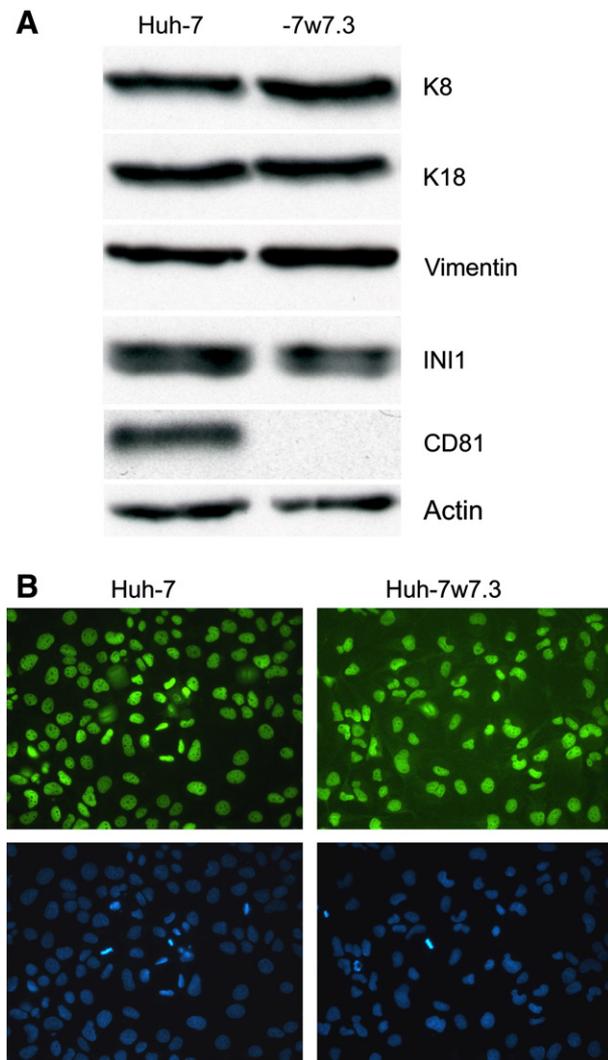


Fig. 6 – Detection of INI1 expression by western blotting and immunofluorescence. A- Total lysates of Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Then, proteins were transferred to nitrocellulose membranes, revealed with antibodies to the indicated antigens and followed by the addition of goat-anti-mouse immunoglobulin conjugated to peroxidase. The proteins of interest were revealed by enhanced chemiluminescence detection. Absence of expression of CD81 is characteristic of Huh-7w7.3 cells. B- Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were immunostained for INI 1 (green) and nuclei (blue). Immunofluorescence revealed a nuclear location of INI1.

in both cells (Fig. 6B). However, to discard any possible mutation in the INI1 product, Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were injected subcutaneously in SCID mice. Solid tumors were isolated after 3 weeks and analyzed for routine hematoxylin and eosin histologic features (see supplementary data, Fig. S7). No differences were observed for tumors generated from Huh-7 and Huh-7w7.3 cells and rhabdoid characteristics were not observed in Huh-7w7.3 tumors suggesting that INI1 gene product is functional and that the cellular clone Huh-7w7.3 is not constituted by hepatocytic rhabdoid cells.

SBs are able to accumulate aggregated keratins

We wanted to determine whether aggregated keratins were able to collapse into the SB structure or to localize out of this structure. For this purpose, Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were transfected with the mutant K18-R89C expressing plasmid [37]. The Arg is highly conserved in K18 sequence and the mutant protein is responsible for the disruption of the fine IF network [38]. GFP-wt-K18, incorporated into endogenous IFs, revealed a fine intracellular network in transfected Huh-7 cells (see supplementary data, Fig. S9A and Fig. 7). In contrast, aggregates and filament disassembly without an intracellular network of keratins were observed in transfected Huh-7 cells with GFP-K18-R89C (Figs. 8A-F) as previously reported [37,38]. Perinuclear aggregates were also detected. The aggregates could also be surrounded by vimentin (Fig. 8F). In contrast, in transfected Huh-7w7.3 cells, GFP-K18-R89C aggregates were redistributed to the SB (Figs. 8G-L). Similar results were observed when Huh-7w7.3/GFP-wt-K18 cells were treated with a proteasome inhibitor (ALLN, 20 μ M)(supplementary data, Fig. S8). Furthermore, in these cells the denaturation of IFs was not specific to keratins since vimentin filaments were also targeted by ALLN treatment. As a control, GFP-K18 transfected cells were treated with ALLN and cells were immunostained with antibodies to p62 to prove the formation of aggregates since p62 proteins colocalize with aggregates [29] (see supplementary data, Fig. S9). These data indicate that disrupted or aggregated IFs might be relocated to the SB structure.

Discussion

The presence of cytoplasmic inclusion bodies, such as neurofibrillary tangles in neurons (Alzheimer disease), Lewy bodies in neurons (Parkinson disease) or spheroid bodies in Amyotrophic lateral sclerosis are hallmark lesions of a variety of diseases [39,40]. These diseases are caused by modifications in protein structures, mainly misfolding or unfolding, and called conformational diseases [41]. When the proteolytic activity of the proteasome is exhausted, misfolded, unfolded and ubiquitinated proteins aggregate into the cytosol leading to a structure termed aggresome [41–43]. The existence of IF inclusions associated with ubiquitin has been reported for various diseases (for review [44,45]) and is a common feature of IF- containing inclusion bodies. Among hepatocellular cytoplasmic inclusions, MDBs are well-characterized cytoplasmic inclusions in hepatocytes [12] that contain K8 and K18.

In the present study, we described an intracytoplasmic body noted SB that displays an accumulation of K8/K18 surrounded by a cage of vimentin. We showed that the presence of a keratin-containing body affects the cell morphology and mainly the shape of the nucleus, which appeared sometimes distorted. Indeed, K18 seemed occasionally to constrict the Huh-7w7.3 cell nucleus (see supplementary data, Fig. S10. mov). DAPI staining revealed that cell nuclei appeared more distorted in presence of SB and more than one nucleus were sometimes observed in Huh-7w7.3 cells. Moreover, this study revealed that lack of accumulation of non-keratin components such as p62 and Hsp90 was found in SB, suggesting that it does not contain aggregated proteins. This structure is not related to MDBs, which are similar to aggresomes. The term of inclusion body, applied to the intracellular foci into

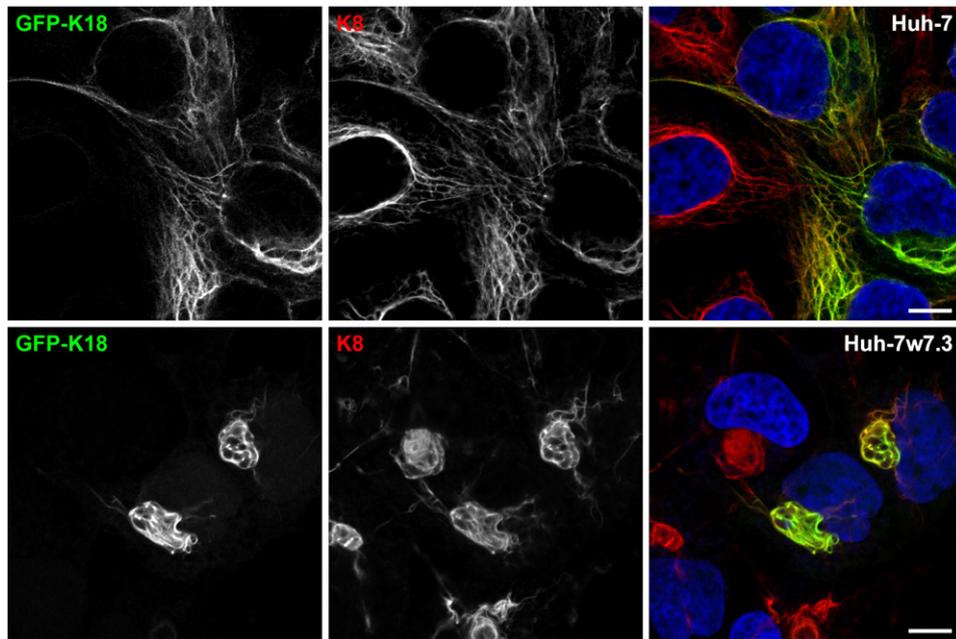


Fig. 7 – Location of GFP-wt-K18 in the SB is not depending on K18 primary sequence. Confocal laser scanning microscopic images of GFP-wt-K18- transfected Huh-7 and Huh-7w7.3 cells are presented. IF proteins were immunostained with antibodies to K8 (red) and nucleus was stained in blue with DAPI. GFP-wt-K18 were revealed in green. A merge image is shown in color picture and a filamentous network of IFs is observed in Huh-7 cells but IFs are whorled in Huh-7w7.3 and are located to the SB. Bar, 10 μ m.

which aggregated proteins are sequestered [41], is not appropriate for the SB. This unusual intracytoplasmic body presents a regularly shaped large perinuclear body with occasional dense material in the middle surrounded by a bright halo. No limiting membrane was detected by EM. Interestingly, we found that the presence of filamentous material presenting a whorled array, observed in EM, corresponds to K8 and K18 that are enclosed in a vimentin cage-like structure. Given that during mitosis the body structure disassembles and reassembles as a unique body in each divided cell, K8 and K18 have likely kept all their reorganization capacity. Indeed, during mitosis, we showed that the SB is disassembled probably after the metaphase and reconstituted in cytokinesis. Returning spheroid body structure in the cytoplasm coincides with nuclear reconstruction, as observed in real-time imaging (supplementary data). Usually keratins start to disassemble early during the prophase (early or late) and their structure is recovered during the telophase or in cytokinesis according to the cells observed by immunofluorescence [46]. As observed in Fig. 4 (white arrow and supplemental data, Fig. S4) the immunostaining for K18 revealed that during metaphase the SB is still visualized and not yet disassembled. The process involved in the disassembly of the SB would begin after metaphase and would be completed during anaphase. In Huh-7w7.3 cells, the delayed disruption of K8/K18 could be due to the presence of the vimentin cage-like structure. Indeed, the timing between keratin reorganization and vimentin is not the same as observed by Lane and collaborators [46]. Disruption of K8/K18 could be conditioned by vimentin dissociation which is performed late in mitosis. During the cell cycle, one established mechanism by which filaments disassembly and reassembly occurs is the phosphorylation by Ser/Thr kinases and the dephosphorylation by phosphatases [47]. As the formation of the SB is well conserved during cell passages, we speculate that

keratins maintain the capacity to be phosphorylated/dephosphorylated in order to regulate properly the assembly-disassembly of this body. However, this needs to be confirmed.

Adult hepatocytes exclusively express K8/K18 [8] in which mutations are a risk for liver disease progression [48–50]. However, no difference was revealed in primary sequence of K8 and K18 or vimentin produced in Huh-7 and Huh-7w7.3 cells, suggesting that SB formation is not due to mutations in these IF proteins. We hypothesized that the presence of a cellular determinant in Huh-7w7.3 cells might be responsible for the SB formation. Indeed, the use of GFP-tagged IF protein has provided new insights into the assembly of IFs in cells. Ectopic expression of K18 revealed that GFP-wt K18 proteins [35] were relocated to whorled filaments in Huh-7w7.3 and not in Huh-7 cells, suggesting an unknown perturbation in these cells. This points to the existence of mechanisms that can modulate the organization of IFs. Furthermore, by expressing the mutant GFP-K18-R89C [37], mutant K18 was relocated in the SB as does the GFP-wt-K18. Similar observations have been obtained with a proteasome inhibitor, which promotes formation of IF inclusions, similar to aggresomes and MDBs [35]. Our data indicate that normal and abnormally organized keratins are able to be relocated in the SB, likely due to the presence of a cellular determinant specifically expressed in Huh-7w7.3 cells. In this manner, SB constitutively formed in these cells presents a unique characteristic among cells containing cytoplasmic bodies that have been described until now.

The most striking observation in Huh-7w7.3 cells is the retraction of K8/K18 and vimentin in a whorled array constituting the SB. We have hypothesized that the formation of the SB is due probably to some cellular factor(s). From an ultrastructural point of view, in normal cells, the keratin filaments radiate from the nuclear region to a cytoplasmic plaque, which serves as

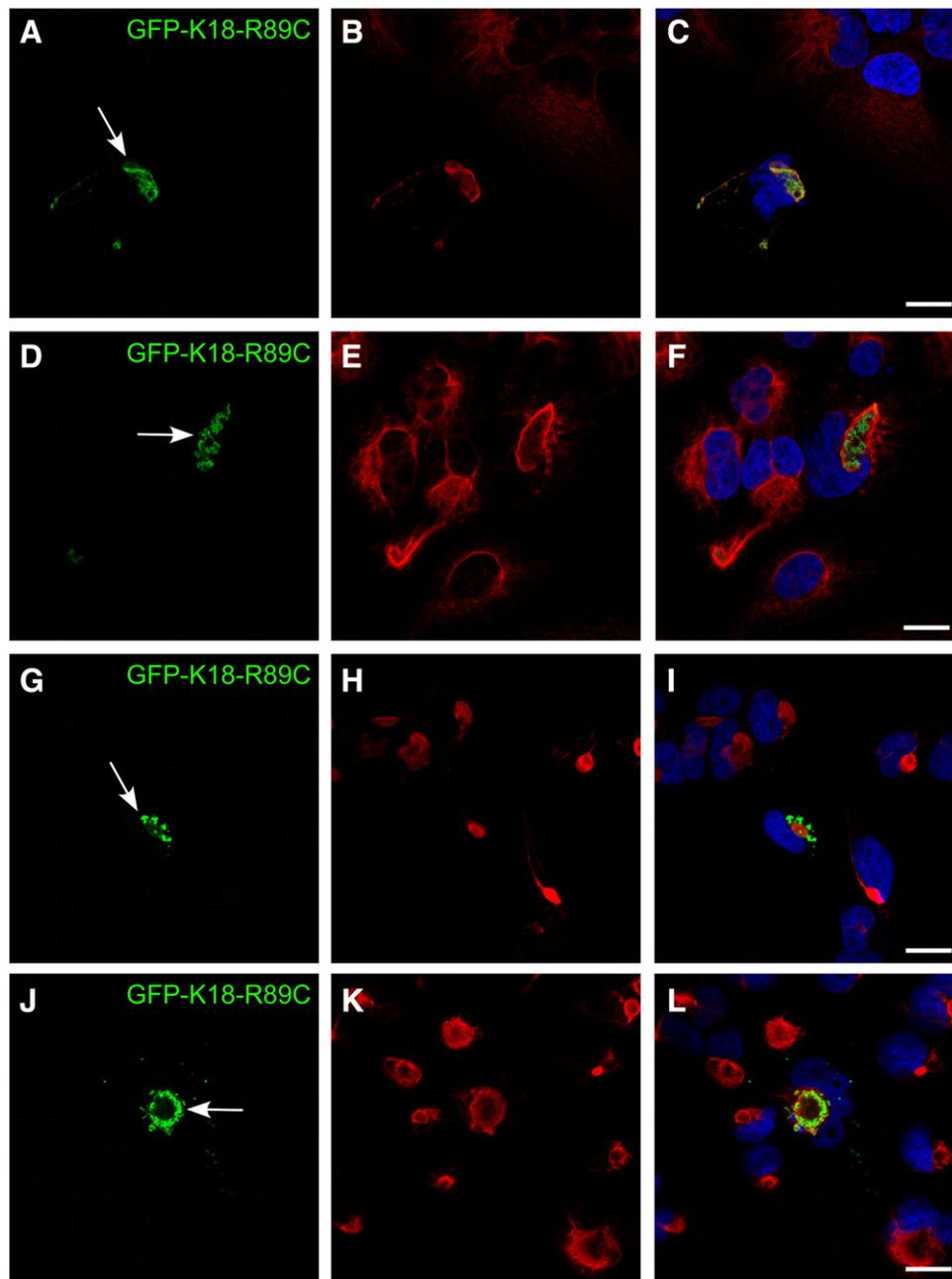


Fig. 8 – Localization of GFP- K18-R89C in SB. GFP-K18-R89C – transfected Huh-7 (A-F) and Huh-7w7.3 cells (G-L) were immunostained with antibodies to K8 (B and H) and vimentin (E and K). K8 and vimentin are revealed in red, GFP-K18-R89C in green (A, D, G and J) and nucleus in blue with the DAPI. Merge images are presented (C, F, I and L). Keratin aggregates in Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were observed with the expression of GFP-K18-R89C as indicated by arrows. Aggregates of GFP-K18-R89C were relocated to the SB (G, I, J and L). Microscopic images were acquired by confocal laser scanning. Bar, 20 μ m.

an anchorage site for these keratin filaments. This cytoplasmic plaque is a part of the desmosome (for review see, [51,52]) and composed of different proteins. Among these proteins, plakins such desmoplakin (DP) are typical cytoskeletal linker proteins [53,54], which are assembled according to a hierarchy of protein-protein interactions. It is possible that these proteins are the targets of the cellular factor(s), which can prevent the linker function of these proteins. It has been shown that the carboxyl terminus of DP-I specifically coaligns with and disrupts both keratin and vimentin intermediate filament networks [55]. The cellular

factor(s) can modify interactions between the SB component proteins by post-translational modifications or interacting proteins. Another possibility is that the cellular factor(s) interacts directly on the proteins preventing their linker functions. Another cytoskeletal linker protein is plectin which interacts with IF proteins, tubulins and actins [56]. However, if post-translational modifications occur on plectin, these modifications must be specific of IF proteins since the distribution of actin microfilaments and of microtubules is not modified in Huh-7w7.3 cells. Finally, the possibility that some post-translational modifications

such as phosphorylation and sumoylation [57] occurring on keratin proteins cannot be discarded.

Moreover, we showed that Huh-7w7.3 cells efficiently replicate HCV. These data suggest that the remodelled K8/K18 proteins do not affect HCV replication, conversely the formation of the SB is not disturbed by viral proteins expressed during HCV infection. Furthermore, the virus produced after transfection of Huh-7w7.3 cells with a full length viral RNA transcribed *in vitro* was infectious, suggesting that the viral secretion was not disturbed.

K8 and K18 which are mainly expressed in a variety of single-layered or simple epithelial tissues are also persistently expressed in a variety of carcinomas derived from visceral epithelia [58]. The presence of cytoplasmic filament bundles, concentrated in whorled arrays have also been described as a cytoplasmic feature of MRT cells, which in some cases have been characterized as K8/K18 filaments [59]. Studies on MRT have revealed the presence of mutations which might be involved in the formation of intracytoplasmic inclusion body [60]. In our case, no mutation was detected, which might suggest that the process of body formation is quite different. It would be interesting to introduce these mutations in GFP-K8 to verify if expression of this construct can induce intracytoplasmic inclusion body formation. MRT is also characterized with a specific chromosomal abnormality detected in established cell lines. Thus, the chromatin-remodeling hSNF5/INI1 gene has been described to be inactivated [18,19]. In our study, we showed that INI1 was expressed in Huh-7 and Huh-7w7.3 cells suggesting that SB formation is not dependent on the expression of this gene product. Finally, the presence of cytoplasmic whorls of IFs is likely not sufficient to predict a complete rhabdoid feature.

In conclusion, our cellular clone containing an unusual cytoplasmic body offers a new exciting research tool for the study of intracellular bodies and in the research of genes, which can modulate the effects on IF protein organization. The characterization of potential factors involved in IF organization may also provide new clues related to cytoplasmic body formation.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.018.

Acknowledgments

We thank Philip Meuleman for critical reading of the manuscript. We thank Sophana Ung for the preparation of the figures. Some data were generated with the help of Dr E. Werkmeister from the Imaging Core Facility of the Calmette campus (MICPaL).

REFERENCES

- [1] E. Fuchs, D.W. Cleveland, A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease, *Science* 279 (1998) 514–519.
- [2] N.O. Ku, X. Zhou, D.M. Toivola, M.B. Omary, The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) G1108–G1137.
- [3] I. Szeverenyi, A.J. Cassidy, C.W. Chung, B.T. Lee, J.E. Common, S.C. Ogg, H. Chen, S.Y. Sim, W.L. Goh, K.W. Ng, J.A. Simpson, L.L. Chee, G.H. Eng, B. Li, D.P. Lunny, D. Chuon, A. Venkatesh, K.H. Khoo, W.H. McLean, Y.P. Lim, E.B. Lane, The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 351–360.
- [4] E. Fuchs, K. Weber, Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 345–382.
- [5] J. Schweizer, P.E. Bowden, P.A. Coulombe, L. Langbein, E.B. Lane, T.M. Magin, L. Maltais, M.B. Omary, D.A. Parry, M.A. Rogers, M.W. Wright, New consensus nomenclature for mammalian keratins, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 169–174.
- [6] H. Herrmann, M. Hesse, M. Reichenzeller, U. Aebi, T.M. Magin, Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation, *Int. Rev. Cytol.* 223 (2003) 83–175.
- [7] P.A. Coulombe, M.B. Omary, 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 110–122.
- [8] M.B. Omary, N.O. Ku, D.M. Toivola, Keratins: guardians of the liver, *Hepatology* 35 (2002) 251–257.
- [9] R.A. Quinlan, M. Hatzfeld, W.W. Franke, A. Lustig, T. Schulthess, J. Engel, Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins, *J. Mol. Biol.* 192 (1986) 337–349.
- [10] H. Denk, C. Stumptner, K. Zatloukal, Mallory bodies revisited, *J. Hepatol.* 32 (2000) 689–702.
- [11] N.O. Ku, P. Strnad, B.H. Zhong, G.Z. Tao, M.B. Omary, Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies, *Hepatology* 46 (2007) 1639–1649.
- [12] K. Zatloukal, S.W. French, C. Stumptner, P. Strnad, M. Harada, D.M. Toivola, M. Cadrin, M.B. Omary, From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 2033–2049.
- [13] J.B. Beckwith, N.F. Palmer, Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study, *Cancer* 41 (1978) 1937–1948.
- [14] J.E. Haas, N.F. Palmer, A.G. Weinberg, J.B. Beckwith, Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney. A distinctive renal tumor of children, *Hum. Pathol.* 12 (1981) 646–657.
- [15] D.M. Parham, S.C. Peiper, G. Robicheaux, R.C. Ribeiro, E.C. Douglass, Malignant rhabdoid tumor of the liver. Evidence for epithelial differentiation, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112 (1988) 61–64.
- [16] S.J. Hunt, W.D. Anderson, Malignant rhabdoid tumor of the liver. A distinct clinicopathologic entity, *Am. J. Clin. Pathol.* 94 (1990) 645–648.
- [17] J.A. Biegel, J.Y. Zhou, L.B. Rorke, C. Stenstrom, L.M. Wainwright, B. Fogelgren, Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors, *Cancer Res.* 59 (1999) 74–79.
- [18] M.F. Rousseau-Merck, I. Versteeg, I. Legrand, J. Couturier, A. Mairal, O. Delattre, A. Aurias, hSNF5/INI1 inactivation is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors, *Cancer Res.* 59 (1999) 3152–3156.
- [19] I. Versteeg, N. Sevenet, J. Lange, M.F. Rousseau-Merck, P. Ambros, R. Handgretinger, A. Aurias, O. Delattre, Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer, *Nature* 394 (1998) 203–206.
- [20] D. Delgrange, A. Pillez, S. Castelain, L. Cocquerel, Y. Rouille, J. Dubuisson, T. Wakita, G. Duverlie, C. Wychowski, Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins, *J. Gen. Virol.* 88 (2007) 2495–2503.
- [21] V. Rocha-Perugini, M. Lavie, D. Delgrange, J. Canton, A. Pillez, J. Potel, C. Lecocoeur, E. Rubinstein, J. Dubuisson, C. Wychowski, L. Cocquerel, The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry, *BMC Microbiol.* 9 (2009) 111.
- [22] S. Charrin, F. Le Naour, V. Labas, M. Billard, J.P. Le Caer, J.F. Emile, M.A. Petit, C. Boucheix, E. Rubinstein, EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells, *Biochem. J.* 373 (2003) 409–421.
- [23] V. Rocha-Perugini, C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, L. Cocquerel, The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry, *PLoS ONE* 3 (2008) e1866.

- [24] P. Maillard, K. Krawczynski, J. Nitkiewicz, C. Bronnert, M. Sidorkiewicz, P. Gounon, J. Dubuisson, G. Faure, R. Crainic, A. Budkowska, Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients, *J. Virol.* 75 (2001) 8240–8250.
- [25] Y. Rouille, F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A.H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, J. Dubuisson, Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus, *J. Virol.* 80 (2006) 2832–2841.
- [26] N.O. Ku, D.M. Toivola, Q. Zhou, G.Z. Tao, B. Zhong, M.B. Omary, Studying simple epithelial keratins in cells and tissues, *Meth. Cell Biol.* 78 (2004) 489–517.
- [27] T. Wakita, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, T.J. Liang, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, *Nat. Med.* 11 (2005) 791–796.
- [28] L. Cocquerel, C. Voisset, J. Dubuisson, Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions, *J. Gen. Virol.* 87 (2006) 1075–1084.
- [29] K. Zatloukal, C. Stumptner, A. Fuchsichler, H. Heid, M. Schnoelzer, L. Kenner, R. Kleinert, M. Prinz, A. Aguzzi, H. Denk, p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 255–263.
- [30] C. Stumptner, A. Fuchsichler, H. Heid, K. Zatloukal, H. Denk, Mallory body—a disease-associated type of sequestosome, *Hepatology* 35 (2002) 1053–1062.
- [31] N.E. Riley, J. Li, L.W. McPhaul, F. Bardag-Gorce, Y.H. Lue, S.W. French, Heat shock proteins are present in mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsy specimens, *Exp. Mol. Pathol.* 74 (2003) 168–172.
- [32] S. Hanada, M. Harada, H. Kumemura, M. Bishr Omary, H. Koga, T. Kawaguchi, E. Taniguchi, T. Yoshida, T. Hisamoto, C. Yanagimoto, M. Maeyama, T. Ueno, M. Sata, Oxidative stress induces the endoplasmic reticulum stress and facilitates inclusion formation in cultured cells, *J. Hepatol.* 47 (2007) 93–102.
- [33] K. Zatloukal, C. Stumptner, M. Lehner, H. Denk, H. Baribault, L.G. Eshkind, W.W. Franke, Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1263–1274.
- [34] I. Nakamichi, D.M. Toivola, P. Strnad, S.A. Michie, R.G. Oshima, H. Baribault, M.B. Omary, Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 931–937.
- [35] M. Harada, H. Kumemura, M.B. Omary, T. Kawaguchi, N. Maeyama, S. Hanada, E. Taniguchi, H. Koga, T. Saganuma, T. Ueno, M. Sata, Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus, *Exp. Cell Res.* 288 (2003) 60–69.
- [36] J.A. Biegel, G. Kalpana, E.S. Knudsen, R.J. Packer, C.W. Roberts, C.J. Thiele, B. Weissman, M. Smith, The role of INI1 and the SWI/SNF complex in the development of rhabdoid tumors: meeting summary from the workshop on childhood atypical teratoid/rhabdoid tumors, *Cancer Res.* 62 (2002) 323–328.
- [37] N.O. Ku, S. Michie, R.G. Oshima, M.B. Omary, Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant, *J. Cell Biol.* 131 (1995) 1303–1314.
- [38] H. Kumemura, M. Harada, M.B. Omary, S. Sakisaka, T. Saganuma, M. Namba, M. Sata, Aggregation and loss of cytokeratin filament networks inhibit golgi organization in liver-derived epithelial cell lines, *Cell Motil. Cytoskeleton* 57 (2004) 37–52.
- [39] R.J. Mayer, J. Lowe, G. Lennox, F. Doherty, M. Landon, Intermediate filaments and ubiquitin: a new thread in the understanding of chronic neurodegenerative diseases, *Prog. Clin. Biol. Res.* 317 (1989) 809–818.
- [40] N.J. Cairns, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, The cytoskeleton in neurodegenerative diseases, *J. Pathol.* 204 (2004) 438–449.
- [41] J.A. Johnston, C.L. Ward, R.R. Kopito, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1883–1898.
- [42] R. Garcia-Mata, Z. Bebok, E.J. Sorscher, E.S. Sztul, Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 1239–1254.
- [43] R.R. Kopito, Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 524–530.
- [44] M.B. Omary, "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1756–1762.
- [45] M.B. Omary, P.A. Coulombe, W.H. McLean, Intermediate filament proteins and their associated diseases, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2087–2100.
- [46] E.B. Lane, S.L. Goodman, L.K. Trejdosiewicz, Disruption of the keratin filament network during epithelial cell division, *EMBO J.* 1 (1982) 1365–1372.
- [47] M.B. Omary, N.O. Ku, G.Z. Tao, D.M. Toivola, J. Liao, "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 383–394.
- [48] N.O. Ku, J.M. Darling, S.M. Krams, C.O. Esquivel, E.B. Keefe, R.K. Sibley, Y.M. Lee, T.L. Wright, M.B. Omary, Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6063–6068.
- [49] N.O. Ku, R. Gish, T.L. Wright, M.B. Omary, Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1580–1587.
- [50] P. Strnad, T.C. Lienau, G.Z. Tao, L.C. Lazzeroni, F. Stickel, D. Schuppan, M.B. Omary, Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection, *Hepatology* 43 (2006) 1354–1363.
- [51] K.J. Green, M. Bohringer, T. Gocken, J.C. Jones, Intermediate filament associated proteins, *Adv. Protein Chem.* 70 (2005) 143–202.
- [52] K.J. Green, C.A. Gaudry, Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 208–216.
- [53] A.J. North, W.G. Bardsley, J. Hyam, E.A. Bornslaeger, H.C. Cordingley, B. Trinnaman, M. Hatzfeld, et al., Molecular map of the desmosomal plaque, *J. Cell Sci.* 112 (Pt 23) (1999) 4325–4336.
- [54] A. Schmidt, H.W. Heid, S. Schafer, U.A. Nuber, R. Zimbelmann, W.W. Franke, Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage, *Eur. J. Cell Biol.* 65 (1994) 229–245.
- [55] T.S. Stappenbeck, K.J. Green, The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 1197–1209.
- [56] G.A. Rezniczek, G. Walko, G. Wiche, Plectin gene defects lead to various forms of epidermolysis bullosa simplex, *Dermatol. Clin.* 28 (2010) 33–41.
- [57] N.T. Snider, S.V. Weerasinghe, J.A. Iniguez-Lluhi, H. Herrmann, M.B. Omary, Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 2273–2284.
- [58] R. Moll, W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, R. Krepler, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell* 31 (1982) 11–24.
- [59] E. Itakura, S. Tamiya, K. Morita, H. Shiratsuchi, Y. Kinoshita, Y. Oshiro, Y. Oda, S. Ohta, M. Furue, M. Tsuneyoshi, Subcellular distribution of cytokeratin and vimentin in malignant rhabdoid tumor: three-dimensional imaging with confocal laser scanning microscopy and double immunofluorescence, *Mod. Pathol.* 14 (2001) 854–861.
- [60] H. Shiratsuchi, T. Saito, A. Sakamoto, E. Itakura, S. Tamiya, Y. Oshiro, Y. Oda, S. Toh, S. Komiyama, M. Tsuneyoshi, Mutation analysis of human cytokeratin 8 gene in malignant rhabdoid tumor: a possible association with intracytoplasmic inclusion body formation, *Mod. Pathol.* 15 (2002) 146–153.

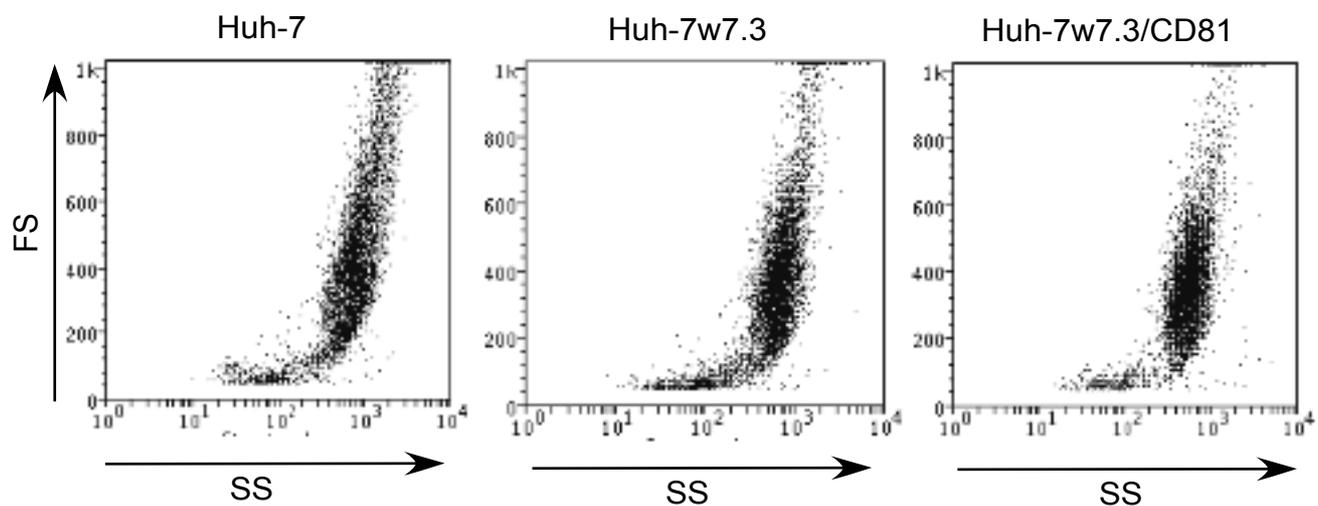


Fig. S1 - Forward scatter and side scatter analyses of Huh-7, Huh-7w7.3 and Huh-7w7.3/CD81 cells. Side scatter (SS) and forward scatter (FS) are shown on x axis and y axis, respectively. Cells were analyzed with a beckman EPICS-XL MCL.

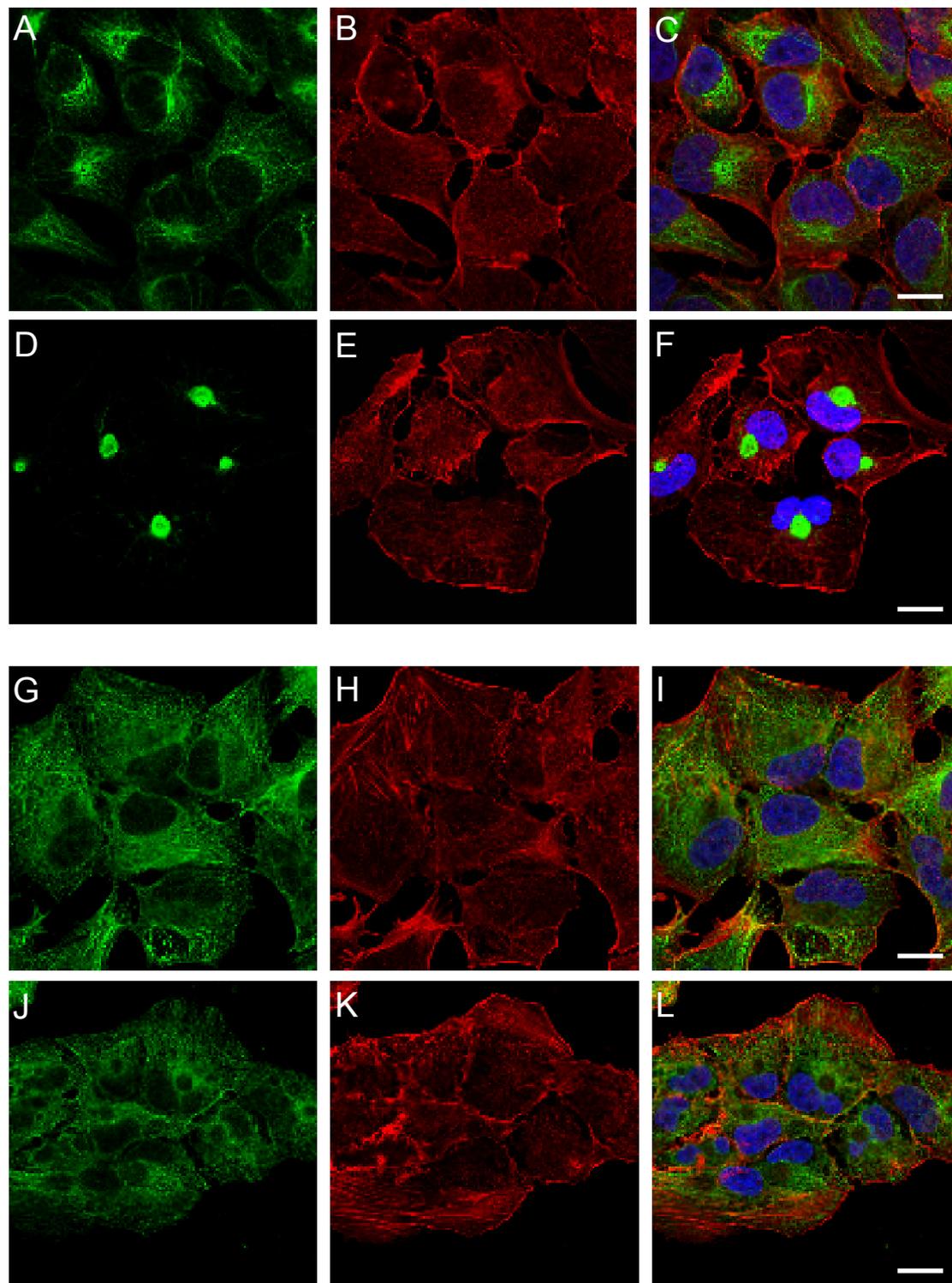


Fig. S3 - Intracellular distribution of actin, β -tubulin and K18 in Huh-7 and Huh-7w7.3 cells.

Huh-7 (A-C and G-I) and Huh-7w7.3 cells (D-F and J-L) were plated on coverslips and were immunostained with antibodies to K18 (A et D) (green), to actin microfilaments (B, E, H and K) (red), to β -tubulin (G and J) (green) and nucleus in blue with DAPI. Merge images are presented (C, F, I and L). In L, SBs are visible as negative coloration. Microscopic images were acquired by confocal laser scanning. Bar, 20 μ m.

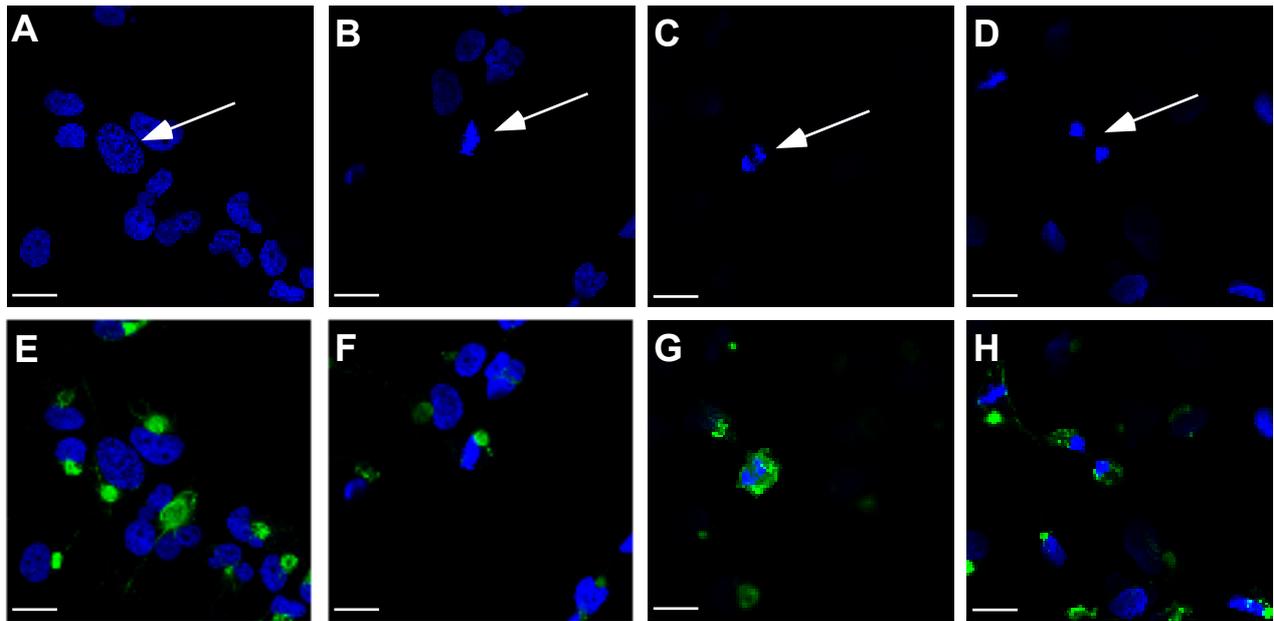


Fig. S4 - Intracellular distribution of K18 in Huh-7w7.3 cells during different steps of the mitosis. Huh-7w7.3 cells were stained with DAPI (A-D) and immunostained with antibodies to K18 (E-H) (green). Merge images are presented (E-H). White arrow indicate a cell in early prophase (A and E), in metaphase (B and F), in anaphase (C and G) and in telophase (D and H). Bar, 20 μ m.

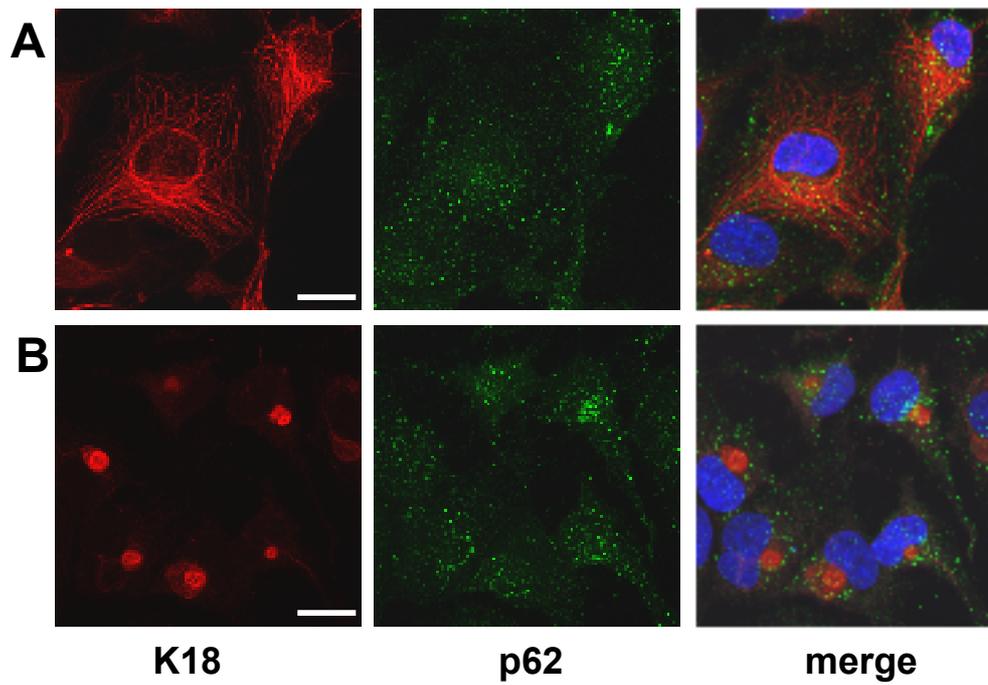


Fig. S5 – Absence of accumulation of p62 in SB. Huh-7 (A) and Huh-7w7.3 (B) cells were immunostained for K18 (red) and p62 (green) and nuclei were labelled with DAPI (blue). Maximal intensity projections of confocal z-stacks are presented. Merge images are presented. Bar, 20 μ m.

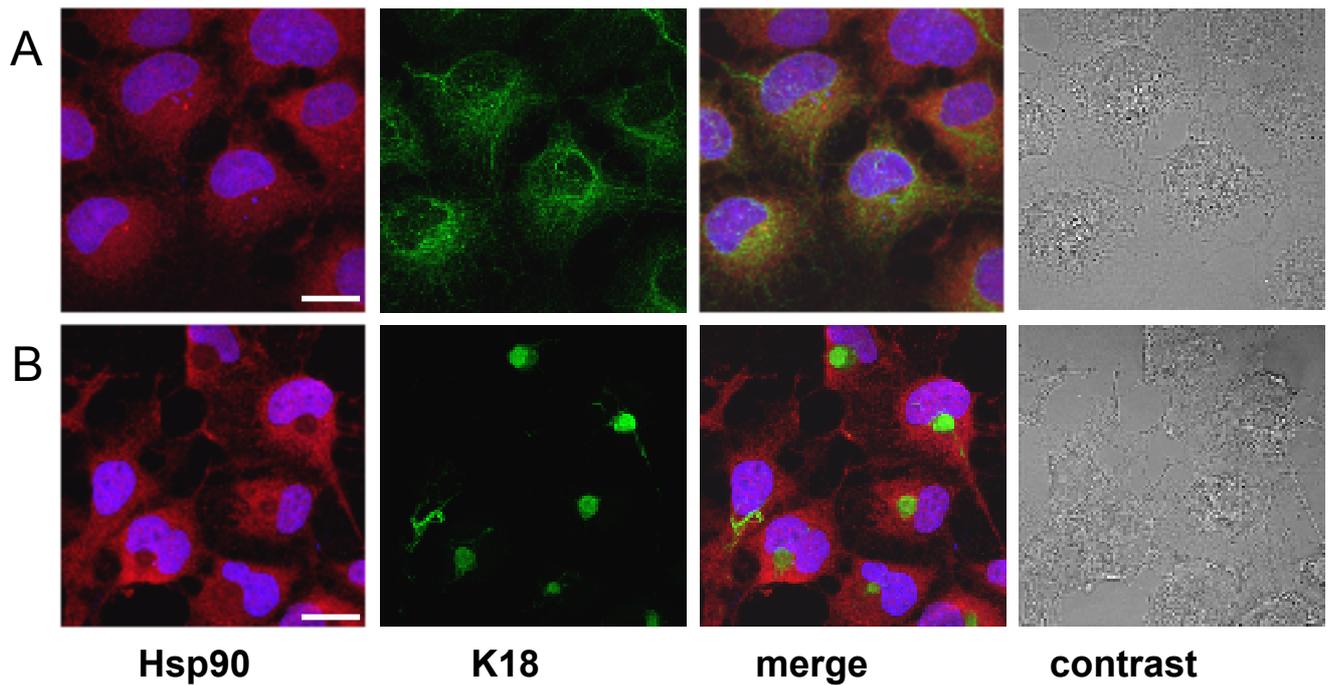
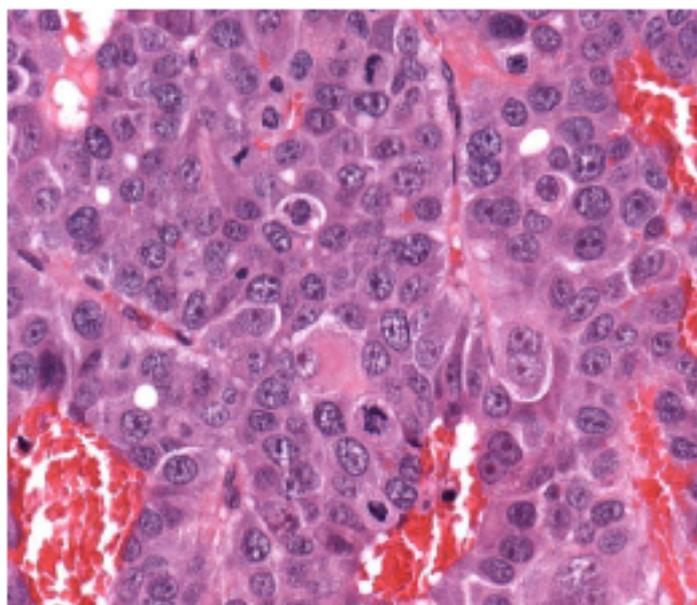


Fig. S6- Localization of Hsp90 was not altered in Huh-7w7.3 cells. Huh-7 (A) and Huh-7w7.3 (B) cells were fixed in PFA and processed for Hsp90 and K18 immunostaining. Hsp90, K18 and nuclei were respectively detected by red, green and blue colors. No signal of Hsp90 was detected in SB. Merge images and a DIC (Differential Interference Contrast) image of the same cells are presented. Bar, 20 μ m.

Huh-7



Huh-7w7.3

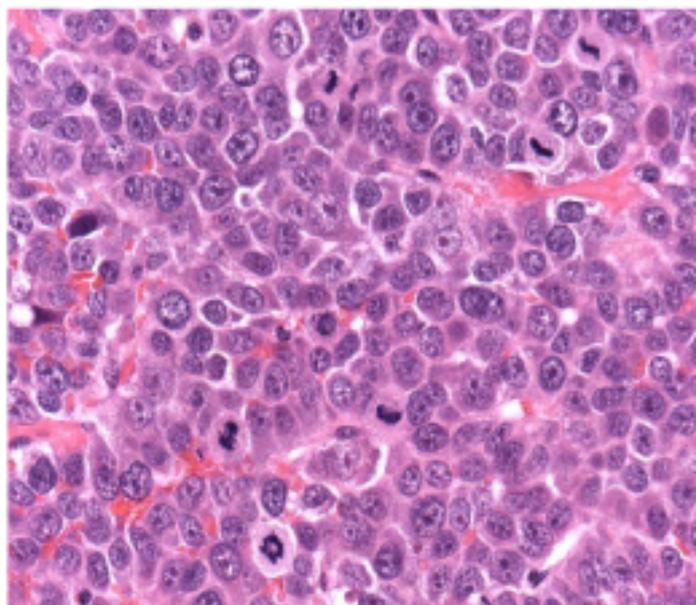


Fig. S7- Light microscopy of sections of tumors induced by Huh-7 and Huh-7w7.3 cells. Solid tumors induced by subcutaneously injection in SCID mice of Huh-7 and Huh-7w7.3 cells were isolated and then, formalin fixed, paraffin embedded, sectioned and stained with hematoxylin, eosin and saffron. Identical magnification was used for all the panels (magnification X400).

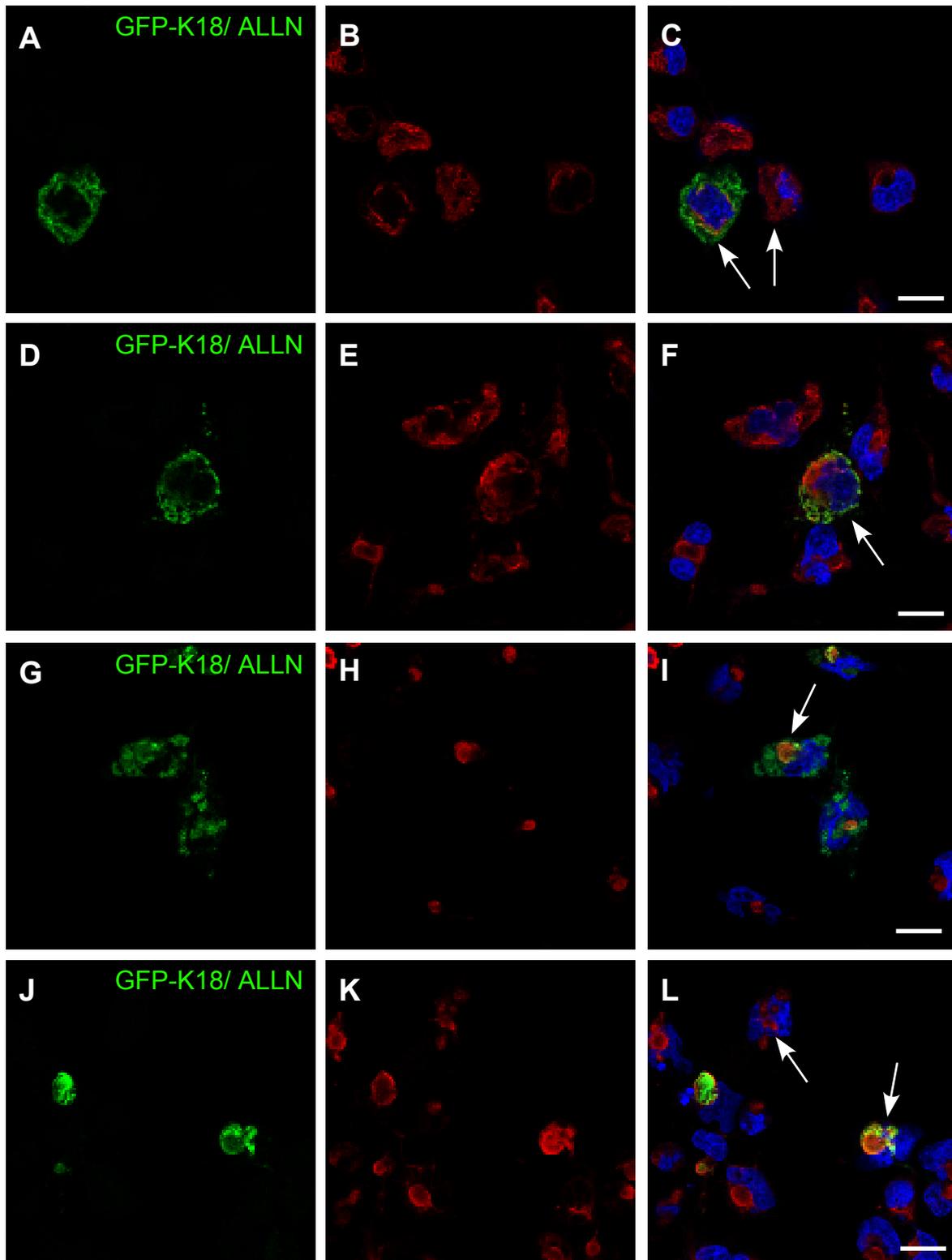


Fig. S8 - Localization of GFP-K18 in ALLN treated cells. GFP-K18 – transfected Huh-7 (A-F) and Huh-7w7.3 cells (G-L) were immunostained with antibodies to K8 (B and H) and vimentin (E and K). K8 and vimentin are revealed in red, GFP-K18 in green (A, D, G and J) and nucleus in blue with the DAPI. Merge images are presented (C, F, I and L). Treatment of GFP-K18- transfected Huh-7 and Huh-7w7.3 cells with ALLN 20 μ M during 24h was responsible for the formation of aggregates of GFP-K18 as indicated by arrows. Aggregates of vimentin were also observed. Microscopic images are acquired by confocal laser scanning. Bar, 20 μ m.

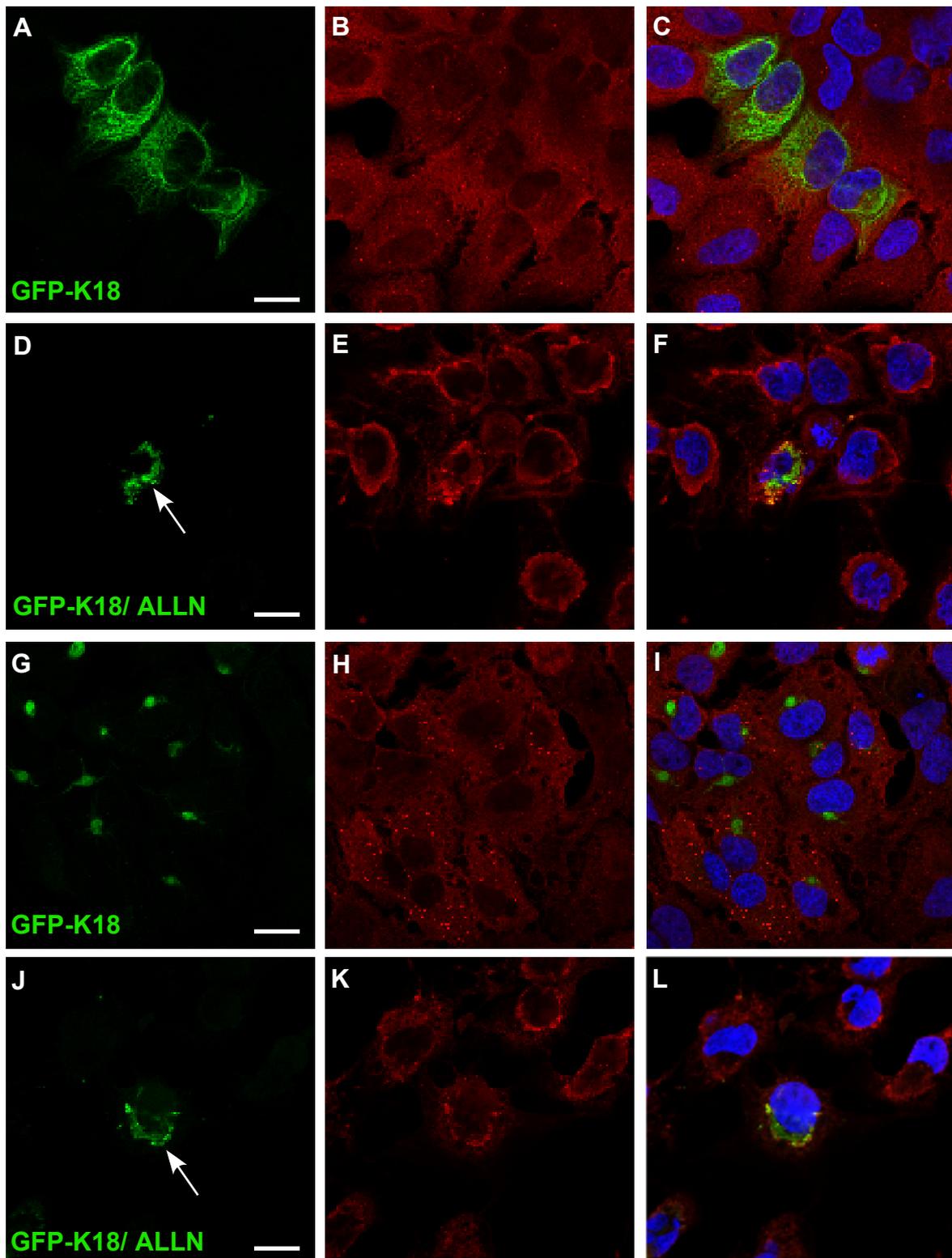


Fig. S9- Altered localization of GFP-K18 and p62 in ALLN- treated cells. GFP-K18 – transfected Huh-7 (A-F) and Huh-7w7.3 cells (G-L) were treated (D-F and J-L) and untreated (A-C and G-I) with ALLN (20 μ M) during 24h. Cells were immunostained with antibodies to p62 and nuclei were stained with the DAPI. GFP-K18, p62 and nuclei were revealed, respectively, in green (A, D, G and J), in red (B, E, H and K) and in blue in merge images (C, F, I and L). In untreated cells GFP-K18 revealed a fine intracellular network in Huh-7 cells (A and C) or typical cytoplasmic whorls of IFs in Huh-7w7.3 cells (G and I). In ALLN- treated cells, immunofluorescence signals of GFP-K18 were colocalized with p62, indicating the presence of aggregates in cells. Microscopic images were acquired by confocal laser scanning. Bar, 20 μ m.

B. Discussion

Les inclusions cytoplasmiques sont des structures que l'on peut observer au sein de cellules impliquées dans différentes maladies. On peut citer les corps de Levy dans les cas de maladie d'Alzheimer ou Parkinson (Cairns et al, 2004; Mayer et al, 1989), l'apparition de corps sphérique pour certaines scléroses (Cairns et al, 2004; Mayer et al, 1989), ou bien encore les corps de Mallory-Denk en ce qui concerne les stéatoses hépatiques (Denk et al, 1979; Mallory, 1911; Zatloukal et al, 2007). Les inclusions décrites sont liées à la présence de lésions et/ou de maladie au niveau de l'organe où elles sont observées. La modification, un mauvais repliement, voire l'absence de repliement de protéines possédant un rôle structural important pour la cellule sont souvent la cause de maladies présentant des corps intra cytoplasmiques (Johnston et al, 1998). Lorsque le processus d'autophagie ou les activités du protéasome sont inefficaces ou inactives, l'agrégation de ces protéines dans le cytosol amène à la formation de structures de type aggrésomes (Garcia-Mata et al, 1999; Johnston et al, 1998; Kopito, 2000). Les maladies liées à l'observation de ce type de structure touchent de nombreux organes. Au niveau des hépatocytes, ce sont les MDBs qui sont observés. Ce type d'inclusion est assez bien caractérisé. Il est observé la plupart du temps dans les cas de stéatose, et il contient les composants des IFs du cytosquelette dans ces cellules : les kératines 8 et 18 (K8/K18) (Zatloukal et al, 2007).

Lors de la mise au point d'une approche nous permettant d'étudier le passage cellule à cellule du HCV, nous avons isolé un clone cellulaire dérivant de la lignée d'hépatocyte Huh-7, appelé Huh-7w7.3, et présentant un corps cytoplasmique que nous avons cherché à caractériser. Celui-ci a été nommé « Spheroid Body » (SB), et nos premières analyses nous ont révélé qu'il s'agissait d'une accumulation des K8 et K18 au sein d'une cage de vimentine. Les cellules Huh-7w7.3 au sein desquelles cette structure a été mise en évidence sont dépourvues du récepteur CD81. Nous avons montré que la présence du SB n'était due ni à l'absence de CD81, ni à l'intégration d'un transgène au sein du génome cellulaire. D'ailleurs, ces structures sont présentes dans une faible proportion de la population Huh-7, ou Huh-7w7. Le fait que ces cellules proviennent initialement d'un carcinome hépatocellulaire pourrait expliquer l'observation de ce phénomène (Nakabayashi et al, 1982). De plus, les cellules de la lignée Huh-7 sont parfois utilisées dans l'étude des MDBs car il est possible d'induire ce type de structures en utilisant certains composés (Harada et al, 2003).

Nos premières observations nous ont permis de décrire un corps de forme globalement sphérique accolé au noyau. Ce dernier peut subir une ou plusieurs constriction à cause de la

présence du SB, amenant parfois à l'observation de plusieurs noyaux pour une même cellule. Les étranglements observés sont dus à la relocalisation des IFs, les K8 et K18, vers le SB. La relocalisation de K8 et K18 peut potentiellement induire tout un ensemble de perturbations du point de vue cellulaire. Les IFs sont responsables de la modulation et de la réalisation de nombreux événements cellulaires (pour revue (Alberti, 2009; Coulombe & Omary, 2002)).

Les inclusions intra-cytoplasmiques peuvent se former suite à un déséquilibre stœchiométrique entre deux composants des IFs, comme c'est le cas pour les MDBs (Nakamichi et al, 2005). Nous avons constaté qu'au sein des cellules Huh-7w7.3, la proportion de K8 était la même que celle de K18. De plus, nous avons remarqué qu'en dehors des kératines, les SB n'accumulaient aucune autre protéine. Or, l'agrégation de protéines est souvent liée à leur association avec des protéines chaperons comme les protéines de choc thermique (Hsp25, Hsp70 ou Hsp90) (Toivola et al, 2010), la poly-ubiquitine et la protéine p62, toutes ces protéines étant impliquées dans le processus de dégradation par le protéasome (Johnston et al, 1998; Zatloukal et al, 2007). Ces protéines étant absentes du SB, ceci nous suggère que les protéines présentes au sein de cette structure ne sont pas agrégées. Ces constatations nous montrent que les SBs ne peuvent pas être directement liés aux MDBs.

La seule délimitation que nous avons observée pour le SB, est une structure composée de vimentine, et formant une cage autour de l'enroulement K8/K18. Le matériel au sein de cette structure est parfois plus dense en son centre. Au niveau du cycle cellulaire nous avons observé que le SB se désassemble durant la division cellulaire, et qu'il est très rapidement reconstitué dans chaque cellule fille après leur séparation. D'ordinaire, les IFs sont désassemblés rapidement au cours de la mitose (Lane et al, 1982), mais dans le cas des SB, les K8 et K18 se désorganisent plus tardivement. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence de la cage de vimentine. La réorganisation de cette dernière protéine survient en effet plus tardivement dans le processus de division cellulaire (Lane et al, 1982). Les kératines à l'intérieur du SB ne pourraient subir leur désorganisation qu'une fois la cage de vimentine désassemblée. En revanche, le SB étant reformé presque immédiatement après la séparation des cellules filles, cela implique la présence d'un mécanisme de constitution de cette structure actif dans les cellules Huh-7w7.3.

La phosphorylation et la déphosphorylation font partie des modifications post-traductionnelles qui touchent les cytokératines (Omary et al, 2006). Ces mécanismes sont connus pour moduler le désassemblage et le réassemblage des IFs au moment de la division cellulaire (Omary et al, 2006). Comme nous avons pu observer que la formation du SB était un mécanisme que l'on retrouvait à travers celle ci, nous pouvons penser que la

phosphorylation et la déphosphorylation des kératines est toujours active. Ceci peut permettre de réguler la formation de ce corps intra cytoplasmique.

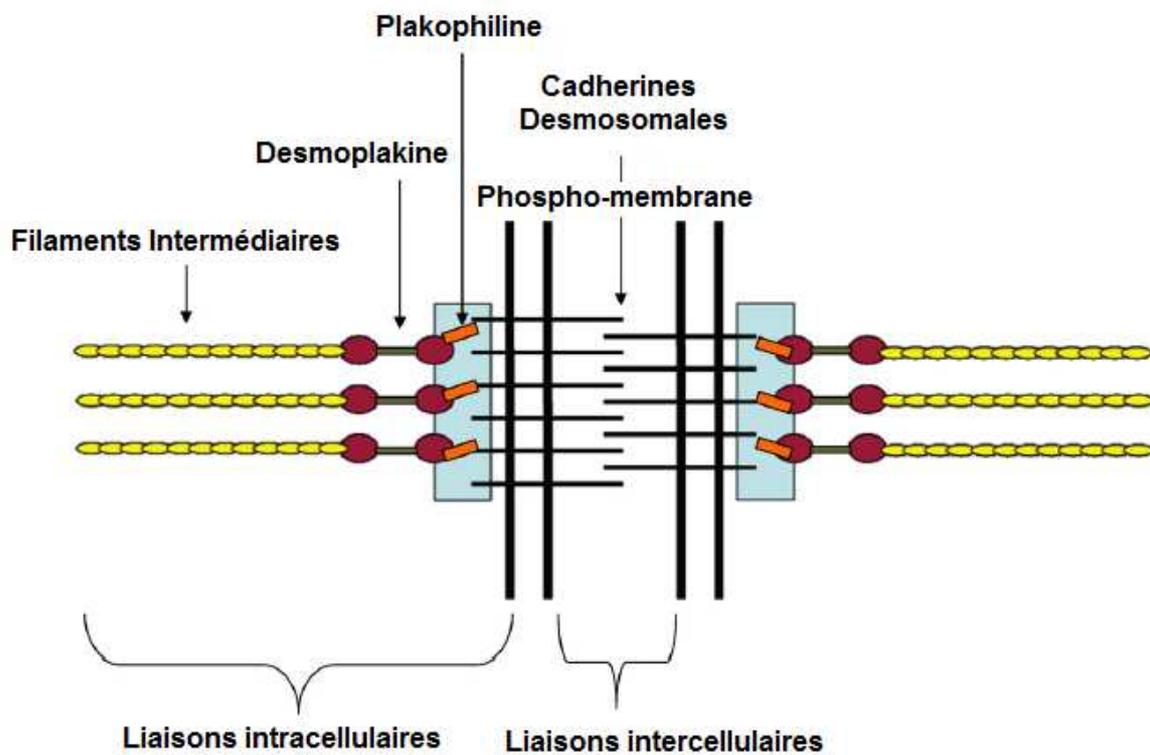
Dans les hépatocytes adultes, les seuls composants des IFs exprimés sont les K8 et K18 (Omary et al, 2002). Leur importance est capitale au niveau de la cellule, et des mutations dans leurs séquences codantes sont à l'origine de tout un lot de dysfonctionnements (Ku et al, 2003; Ku et al, 2001; Strnad et al, 2006). Toutefois, le séquençage complet des ARNm codant les protéines K8, K18 et vimentine nous a permis de constater qu'il n'y avait aucune différence entre les séquences de ces protéines exprimées dans les cellules Huh-7 et Huh-7w7.3. Ce résultat suggère que la formation des SB n'est pas due à la présence de mutations au sein des IFs. La présence, ou la surexpression de certains facteurs cellulaires, pourrait expliquer cette relocalisation des kératines au sein du SB. Nous avons alors fait exprimer la protéine K18 taggée avec la GFP (Harada et al, 2003) au sein des cellules Huh-7w7.3 et Huh-7. La protéine marquée possède une localisation normale au sein des cellules Huh-7, alors que pour les cellules Huh-7w7.3, elle est systématiquement relocalisée vers le SB. Ceci suggère la présence d'un mécanisme ou d'une fonction pour le moment inconnue dans ces cellules. Ce processus est capable de moduler et réorganiser les IFs, permettant de capter les protéines les constituant. Par la suite, l'expression d'un mutant de la K18, taggé lui aussi à la GFP (Ku et al, 1995), et connu pour former des agrégats, nous a permis d'observer que le SB captait également les IFs quelque soit leurs formes. De plus, des observations analogues ont été réalisées grâce à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome (Harada et al, 2003).

Notre attention s'est portée sur certains facteurs amenant à la formation de structures analogues au SB, notamment dans le cas de certaines tumeurs rabdoïdes (Beckwith & Palmer, 1978; Haas et al, 1981; Moll et al, 1982). Pour ces maladies, un des facteurs qui provoque l'agrégation des composants des IFs est la présence de mutations dans la séquence codant les protéines comme K8 et K18 (Shiratsuchi et al, 2002). Bien que nous n'ayons détecté aucune mutation pour les protéines des cellules Huh-7w7.3, il serait intéressant d'introduire ce genre de polymorphisme afin de déterminer quel pourrait en être l'influence. Nous pouvons penser que le SB continuerait à accumuler les IFs quelque soit leur forme. Pour autant, il ne faut pas écarter la possibilité que le processus de formation des tumeurs rabdoïdes est plus fort que les mécanismes régissant la mise en place du SB. Nous pourrions alors détecter la transition d'une structure à l'autre. Le gène INI1 est lui aussi important dans le cadre de la formation des tumeurs rabdoïdes (Kohashi et al, 2007; Versteeg et al, 1998). L'absence d'expression de ce gène amène aussi à la formation de corps intra-cytoplasmiques dans le cas des tumeurs

rabdoïdes. Nous avons comparé l'expression d'INI1 entre les cellules Huh-7 et les cellules Huh-7w7.3, et nous n'avons trouvé aucune différence. Ces données nous permettent de penser que la formation du SB n'a aucun lien direct avec l'expression de ce gène. Cependant, nous ne pouvons pas écarter l'éventualité d'une perturbation d'un élément intervenant en aval de l'expression d'INI1 et qui pourrait expliquer la formation du SB.

La formation du SB est probablement due à certains facteurs cellulaires qui restent à identifier. Les composants des IFs K8 et K18 sont relocalisés dans le SB. Nous avons pu voir dans l'introduction de cette thèse que le cytosquelette est une structure dynamique au sein de la cellule, et qu'elle implique de nombreux acteurs à différents niveaux. Habituellement, les IFs possèdent des points d'ancrage dans la membrane cellulaire grâce à leurs interactions avec les desmosomes (Green et al, 2005; Green & Gaudry, 2000). L'association entre IFs et desmosomes est primordiale en ce qui concerne l'association des cellules entre elles. Les desmosomes vont ainsi avoir une double fonction, la première est de fournir des points d'ancrage aux IFs dans la membrane cellulaire, et la seconde d'associer plusieurs cellules entre elles (Figure 30). Cette association a pour effet de fournir une plus grande résistance à des stress mécaniques au niveau d'un organe par exemple (pour revue (Garrod & Chidgey, 2008)). Ces structures sont constituées par l'assemblage de différentes protéines, parmi lesquelles on retrouve les plakines et les desmoplakines, qui jouent principalement le rôle de linker du cytosquelette avec la membrane (North et al, 1999; Schmidt et al, 1994). Il a pu être montré que des inhibiteurs de ces protéines perturbaient la formation des IFs constitués de kératines ou de vimentine (Stappenbeck & Green, 1992). De plus, différentes maladies ont été décrites comme ayant un rapport avec une perturbation des desmosomes (pour revue (Garrod & Chidgey, 2008)). Par conséquent, nous pouvons penser que la formation du SB peut être liée à un mécanisme qui cible les protéines des desmosomes et perturbe, voire inactive, leur fonction de linker entre les IFs et les membranes cellulaires. Sans point d'attache, les IFs se regrouperaient alors au sein du SB. Les interactions entre les desmosomes et les IFs pourraient également être perturbées par la présence de modifications post-traductionnelles. Ces dernières agiraient directement sur les protéines concernées ou pourraient avoir un effet via une cascade d'évènements. Les protéines des IFs sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (Hyder et al, 2011) comme nous avons pu le voir. Parmi ces modifications, on peut citer la phosphorylation (Omary et al, 2006), que nous avons abordé un peu plus haut, et la O-glycosylation (Rotty et al, 2010; Srikanth et al, 2010). La première est responsable en partie d'une conformation des IFs, alors que la seconde est associée à un processus de protection vis-à-vis de différents stress que la cellule peut subir.

De plus, ces deux modifications post-traductionnelles ciblent les mêmes sites (Hart et al, 1995; Wells et al, 2004). La balance entre ces deux modifications au sein des protéines des IFs étant très importante, il serait pertinent de mener une étude sur leur effet au niveau du SB et des cellules Huh-7w7.3.



(Adapté d'après(Garrod & Chidgey, 2008))

Figure 30 : Représentation schématique de l'organisation des desmosomes.

C. Conclusions et perspectives

Dans le cadre de la mise au point d'un outil d'étude, nous avons isolé fortuitement un clone cellulaire d'hépatocyte présentant un corps intra cytoplasmique. En caractérisant cette structure, appelée SB, nous avons montré qu'elle concentrait les composants des IFs, à savoir les protéines K8 et K18, au sein d'une cage de vimentine. La formation de cette structure n'est pas liée aux méthodes utilisées dans la mise au point de l'outil d'étude que nous voulions mettre en place. De plus, ce type de structure est retrouvé dans une faible proportion de la population d'hépatocytes à partir de laquelle ce clone cellulaire a été sélectionné.

Des inclusions intra cytoplasmiques sont observées dans un grand nombre de maladies, et sont souvent liées à un dysfonctionnement au niveau de la constitution des IFs (Cairns et al, 2004; Denk et al, 1979; Mayer et al, 1989). Les causes de ce dysfonctionnement peuvent être nombreuses, et elles incluent la mutation des protéines constituant IFs (Ku et al, 2003; Ku et al, 2001; Strnad et al, 2006), mais aussi l'association à certaines protéines en réponse à un stress causé à la cellule. Nous avons montré que la formation du SB n'avait aucun lien avec ces premiers facteurs. Leur présence dans certaines cellules de la population initialement utilisée nous amène à penser que la formation de ce corps intra cytoplasmique pourrait être une étape préliminaire à la constitution d'inclusions cytoplasmiques déjà bien caractérisées, comme les MDBs. Notre étude n'a pas permis de montrer un lien direct entre ces deux structures. Cependant, les cellules Huh-7w7.3 dans lesquelles sont exprimés les SB dérivent de la lignée Huh-7 dans laquelle il est possible d'induire la formation de MDBs (Harada et al, 2003).

La formation des inclusions intra cytoplasmiques, la perturbation et l'accumulation des IFs au sein des cellules, peuvent avoir de nombreuses origines. Dans cette première étude, nous avons cherché à caractériser le SB, de manière à savoir si cette structure n'avait pas de lien apparent avec des corps intra cytoplasmiques déjà décrits. Nos résultats nous montrent que, pour le moment, nous ne pouvons relier le SB à des structures connues. Une approche intéressante serait de réaliser une étude de comparaison par transcriptomique entre les cellules Huh-7w7 et Huh-7w7.3. Les résultats que nous obtiendrions de cette manière nous permettraient d'orienter de manière ciblée la recherche des mécanismes amenant à la formation du SB, ce qui nous permettrait à terme une meilleure compréhension du rôle de cette structure. Celle-ci pourrait s'avérer être un modèle dans l'étude des inclusions intra cytoplasmiques, et des processus perturbant l'organisation du cytosquelette et des IFs.

Comme nous l'avons vu dans la discussion, les modifications post-traductionnelles peuvent être responsables de perturbations au niveau de la régulation des protéines. Il serait intéressant dans une future étude de vérifier si ce type de modification influence la formation des SBs, ainsi que leur composition. En particulier s'agissant de la phosphorylation et la O-glycosylation, qui sont des modifications importantes pour les kératines, et qui concerne les mêmes sites de modifications sur ces protéines.

La structure que nous avons décrite déstabilise complètement l'organisation interne de la cellule, puisque sa présence induit une relocalisation complète des kératines à l'intérieur d'une cage de vimentine. Certaines observations nous ont permis de constater que la présence du SB induisait également une relocalisation de l'appareil de Golgi autour de la cage de vimentine. La cause de cette réorganisation est très certainement la relocalisation des kératines et de la vimentine. On peut supposer que des protéines du Golgi peuvent interagir avec la vimentine ou des protéines associées à cette protéine (Phua et al, 2009). En revanche, les conséquences nous en sont inconnues, et il serait intéressant de connaître les effets que produit une telle réorganisation sur la cellule et son fonctionnement en général.

Le SB étant une structure qui accumule les composants des IFs, les cellules Huh-7w7.3 pourraient servir de modèle dans l'étude des cellules présentant des inclusions intracytoplasmiques. Ce dernier point nous permettrait de tester différents composés, afin de chercher à restaurer une morphologie cellulaire normale.

Bibliographie

V. Bibliographie

Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, 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

Agapov EV, Murray CL, Frolov I, Qu L, Myers TM, Rice CM (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol* **78**: 2414-2425

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (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

Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Pallier C, Brillet R, Pohl RT, Pawlotsky JM (2010) Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology* **138**: 1112-1122

Alberti C (2009) Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **13**: 13-21

Aligo J, Jia S, Manna D, Konan KV (2009) Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. *Virology* **393**: 68-83

Alsaleh K, Delavalle PY, Pillez A, Duverlie G, Descamps V, Rouille Y, Dubuisson J, Wychowski C (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**: 12515-12528

Alter HJ (2005) HCV natural history: the retrospective and prospective in perspective. *J Hepatol* **43**: 550-552

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H (1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**: 459-463

Alter MJ (2007) Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **13**: 2436-2441

Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, 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
- Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K (1997) The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol* **71**: 790-796
- Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M, Ismail S, El Daly M, El-Kafrawy S, Esmat G, Hamid MA, Mohamed MK, Fontanet A (2006) Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut* **55**: 1183-1187
- Bardag-Gorce F, French BA, Lue YH, Nguyen V, Wan YJ, French SW (2001) Mallory bodies formed in proteasome-depleted hepatocytes: an immunohistochemical study. *Exp Mol Pathol* **70**: 7-18
- Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, del Valle Onorato M, Rodes J, Ordinas A (1995) Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* **21**: 639-644
- Barry DM, Millecamps S, Julien JP, Garcia ML (2007) New movements in neurofilament transport, turnover and disease. *Exp Cell Res* **313**: 2110-2120
- Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**: 71-180
- Bartenschlager R, Kaul A, Sparacio S (2003) Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res* **60**: 91-102
- Bartenschlager R, Lohmann V, Wilkinson T, Koch JO (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 MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**: 41003-41012
- Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF (2006) Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* **80**: 10579-10590
- Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, Diepolder HM, Hoffmann M, Neumann-Haefelin C, Thimme R, Henneke P, Klein R, Paranhos-Baccala G, Depla E, Liang TJ, Blum HE, Baumert TF (2005) Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* **105**: 3605-3614

- Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH (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 FL (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 JM, Lavillette D, Cosset FL (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 FL (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
- Basu A, Kanda T, Beyene A, Saito K, Meyer K, Ray R (2007) Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *J Virol* **81**: 3933-3941
- Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* **72**: 3827-3836
- Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ (1999) Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* **117**: 1397-1407
- Baumert TF, Wellnitz S, Aono S, Satoi J, Herion D, Tilman Gerlach J, Pape GR, Lau JY, Hoofnagle JH, Blum HE, Liang TJ (2000) Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **32**: 610-617
- Beckwith JB, Palmer NF (1978) Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* **41**: 1937-1948
- Behrens SE, 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 CA, Frick DN (2009) Fuel specificity of the hepatitis C virus NS3 helicase. *J Mol Biol* **388**: 851-864
- Benedicto I, Molina-Jimenez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, Moreno-Otero R, Valenzuela-Fernandez A, Aldabe R, Lopez-Cabrera M, Majano PL (2009) The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* **83**: 8012-8020
- Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C (2010) Apolipoprotein E interacts with hepatitis C

virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**: 43-53

Beran RK, Lindenbach BD, Pyle AM (2009) The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J Virol* **83**: 3268-3275

Beran RK, Pyle AM (2008) Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem* **283**: 29929-29937

Beran RK, Serebrov V, Pyle AM (2007) The serine protease domain of hepatitis C viral NS3 activates RNA helicase activity by promoting the binding of RNA substrate. *J Biol Chem* **282**: 34913-34920

Bhattacharya D, Accola MA, Ansari IH, Striker R, Rehrauer WM (2011) Naturally Occurring Genotype 2b/1a Hepatitis C Virus in the United States. *Virol J* **8**: 458

Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M, Baumert TF, 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, Roingard P (2002) Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* **76**: 4073-4079

Blight KJ (2007) Allelic variation in the hepatitis C virus NS4B protein dramatically influences RNA replication. *J Virol* **81**: 5724-5736

Blight KJ (2011) Charged residues in hepatitis C virus NS4B are critical for multiple NS4B functions in RNA replication. *J Virol*

Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**: 1972-1974

Blight KJ, McKeating JA, Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**: 13001-13014

Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Haussinger D (2003) IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* **17**: 488-490

Bonifas JM, Rothman AL, Epstein EH, Jr. (1991) Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* **254**: 1202-1205

Boulant S, Becchi M, Penin F, Lavergne JP (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, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J (2008) Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* **9**: 1268-1282
- 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 JP (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* **79**: 11353-11365
- Bourdeaut F, Freneaux P, Thuille B, Lellouch-Tubiana A, Nicolas A, Couturier J, Pierron G, Sainte-Rose C, Bergeron C, Bouvier R, Rialland X, Laurence V, Michon J, Sastre-Garau X, Delattre O (2007) hSNF5/INI1-deficient tumours and rhabdoid tumours are convergent but not fully overlapping entities. *J Pathol* **211**: 323-330
- Bowen DG, Walker CM (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**: 946-952
- Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH (1991) Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* **34**: 206-208
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, Fields HA (1983) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* **148**: 254-265
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Ebert JW, Cook EH, Fields HA, Kemler BJ (1981) Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* **143**: 210-218
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**: 105-117
- Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, 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
- Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* **27**: 117-120

- Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, De Francesco R, Rey FA (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13034-13039
- Brown HG, Troncoso JC, Hoh JH (1998) Neurofilament-L homopolymers are less mechanically stable than native neurofilaments. *J Microsc* **191**: 229-237
- Bukh J, Meuleman P, Tellier R, Engle RE, Feinstone SM, Eder G, Satterfield WC, Govindarajan S, Krawczynski K, Miller RH, Leroux-Roels G, Purcell RH (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 RH, Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4942-4946
- Buonocore L, Blight KJ, Rice CM, Rose JK (2002) Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* **76**: 6865-6872
- Cai Z, Zhang C, Chang KS, Jiang J, Ahn BC, Wakita T, Liang TJ, Luo G (2005) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol* **79**: 13963-13973
- Cairns NJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2004) The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *J Pathol* **204**: 438-449
- Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* **79**: 15331-15341
- 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
- Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J (2004) Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem* **279**: 41384-41392
- Castelain S, Descamps V, Thibault V, Francois C, Bonte D, Morel V, Izopet J, Capron D, Zawadzki P, Duverlie G (2004) TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *J Clin Virol* **31**: 227-234
- Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG (2000) Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol* **149**: 17-22
- Chan Y, Anton-Lamprecht I, Yu QC, Jackel A, Zabel B, Ernst JP, Fuchs E (1994) A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes Dev* **8**: 2574-2587

- Chang KS, 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
- Chatel-Chaix L, Melancon P, Racine ME, Baril M, Lamarre D (2011) Y-Box-Binding Protein-1 Interacts with Hepatitis C Virus NS3/4A and Influences the Equilibrium between Viral RNA Replication and Infectious Particle Production. *J Virol*
- Chatterji U, Bobardt MD, Lim P, Gallay PA (2010) Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *J Gen Virol* **91**: 1189-1193
- Cheng G, Zhong J, Chisari FV (2006) Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8499-8504
- Cheng J, Syder AJ, Yu QC, Letai A, Paller AS, Fuchs E (1992) The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. *Cell* **70**: 811-819
- Chevalier C, Saulnier A, Benureau Y, Flechet D, Delgrange D, Colbere-Garapin F, Wychowski C, Martin A (2007) Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. *Mol Ther* **15**: 1452-1462
- Chevaliez S, Pawlotsky JM (2007) Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* **13**: 2461-2466
- Chipev CC, Korge BP, Markova N, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Compton JG, Steinert PM (1992) A leucine---proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis. *Cell* **70**: 821-828
- Choi SH, Kim SY, Park KJ, Kim YJ, Hwang SB (2004) Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. *J Biochem Mol Biol* **37**: 735-740
- Choo QL, 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 QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, 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 QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2451-2455
- Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS (1995) Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* **76** (Pt 9): 2337-2341
- Choukhi A, Ung S, Wychowski C, Dubuisson J (1998) Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* **72**: 3851-3858

- Chung RT (2005) Acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 1**: S14-17
- Ciczora Y, Callens N, Montpellier C, Bartosch B, Cosset FL, 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 EI, 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
- Ciesek S, Westhaus S, Wicht M, Wappler I, Henschen S, Sarrazin C, Hamdi N, Abdelaziz AI, Strassburg CP, Wedemeyer H, Manns MP, Pietschmann T, von Hahn T (2011) Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles. *J Virol* **85**: 7613-7621
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH (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 JC, 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
- Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J (1998) A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* **72**: 2183-2191
- Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J (2006) Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87**: 1075-1084
- Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J (2000) Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* **74**: 3623-3633
- Collin C, Moll R, Kubicka S, Ouhayoun JP, Franke WW (1992a) Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Exp Cell Res* **202**: 132-141
- Collin C, Ouhayoun JP, Grund C, Franke WW (1992b) Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different. *Differentiation* **51**: 137-148
- Corless L, Crump CM, Griffin SD, 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 EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7270-7274

- Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E (1991) Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* **66**: 1301-1311
- Coulombe PA, Omary MB (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 110-122
- Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV (2000) Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**: 346-355
- Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F (1995) In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* **76** (Pt 10): 2485-2491
- Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA, 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 GL, Lindsay KL (2005) Treatment of chronic hepatitis C infection: one step at a time. *Lancet Infect Dis* **5**: 524-526
- 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 YS, Rice CM, 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
- Denk H, Franke WW, Kerjaschki D, Eckerstorfer R (1979) Mallory bodies in experimental animals and man. *Int Rev Exp Pathol* **20**: 77-121
- Dentzer TG, Lorenz IC, Evans MJ, Rice CM (2009) Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol* **83**: 12702-12713
- Depla M, Uzbekov R, Hourieux C, Blanchard E, Le Gouge A, Gillet L, Roingeard P (2010) Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3151-3161
- Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR (1997) Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* **71**: 6011-6019
- Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C (2003) Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* **77**: 5401-5414

Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A (2011) A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**: 208-211

Dreux M, Dao Thi VL, Fresquet J, Guerin M, Julia Z, Verney G, Durantel D, Zoulim F, Lavillette D, Cosset FL, 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 PE, Keck Z, Fong S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL (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 HE, Boo I, Pountourios P (2007) Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol* **88**: 1144-1148

Drummer HE, Maerz A, Pountourios P (2003) Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **546**: 385-390

Dubois F, Desenclos JC, 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, Duvet S, Meunier JC, 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 HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**: 6147-6160

Dubuisson J, Penin F, Moradpour D (2002) Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* **12**: 517-523

Dubuisson J, Rice CM (1996) Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol* **70**: 778-786

Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, 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

Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, 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 JS (2004) A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* **78**: 11288-11295

- Elazar M, Cheong KH, Liu P, Greenberg HB, Rice CM, Glenn JS (2003) Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77**: 6055-6061
- Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS (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
- Elmowalid GA, Qiao M, Jeong SH, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, Hu Z, Murthy K, Liang TJ (2007) Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8427-8432
- Eng FJ, Walewski JL, Klepper AL, Fishman SL, Desai SM, McMullan LK, Evans MJ, Rice CM, Branch AD (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
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* **96**: 224-230
- Evans MJ, Rice CM, Goff SP (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 MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (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
- Falkowska E, Kajumo F, Garcia E, Reinus J, Dragic T (2007) Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* **81**: 8072-8079
- Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, et al. (1992) Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**: 135-140
- Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH (1996a) Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* **335**: 631-634
- Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH (1991) A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* **325**: 98-104
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzera A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH (1996b) 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

FDA. (2011a) FDA approves Incivek for hepatitis C.

FDA. (2011b) FDA approves Victrelis for Hepatitis C.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**: 767-770

Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH (1983) Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* **41**: 816-821

Feld JJ, Hoofnagle JH (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**: 967-972

Ferreon JC, Ferreon AC, Li K, Lemon SM (2005) Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem* **280**: 20483-20492

Fiorucci M, Boulant S, Fournillier A, Abraham JD, Lavergne JP, 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

Flint M, McKeating JA (1999) The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol* **80** (Pt 8): 1943-1947

Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA (1999) Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* **73**: 6782-6790

Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, Mazzella G, Vandelli C, Nicolas-Metral V, Groscurin P, Liz JS, 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

Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P (1998) In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* **79** (Pt 10): 2367-2374

Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, Gale M, Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**: 1145-1148

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

- Franke WW, Denk H, Schmid E, Osborn M, Weber K (1979) Ultrastructural, biochemical, and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. *Lab Invest* **40**: 207-220
- Friebe P, Bartenschlager R (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* **76**: 5326-5338
- Friebe P, Boudet J, Simorre JP, 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
- Fruhwald MC, Hasselblatt M, Wirth S, Kohler G, Schneppenheim R, Subero JI, Siebert R, Kordes U, Jurgens H, Vormoor J (2006) Non-linkage of familial rhabdoid tumors to SMARCB1 implies a second locus for the rhabdoid tumor predisposition syndrome. *Pediatr Blood Cancer* **47**: 273-278
- Fuchs E, Cleveland DW (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**: 514-519
- Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG (1998a) Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* **18**: 5208-5218
- Gale MJ, Jr., Korth MJ, Katze MG (1998b) Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* **10**: 157-162
- Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**: 1239-1254
- Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4498-4503
- Gardner MK, Hunt AJ, Goodson HV, Odde DJ (2008) Microtubule assembly dynamics: new insights at the nanoscale. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 64-70
- Garrod D, Chidgey M (2008) Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 572-587
- Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**: 2120-2129
- Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**: 11074-11081

- Gaudy C, Goudeau A (2005) La diversité du virus de l'Hépatite C : méthodes d'études, implication dans la pathogenèse et la résistance au traitement. *Virologie* **9**: 343-355
- Gazak R, Walterova D, Kren V (2007) Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* **14**: 315-338
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117**: 933-941
- Goebel HH (2003) Congenital myopathies at their molecular dawning. *Muscle Nerve* **27**: 527-548
- Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, 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 HE, 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 JM, Jensen TB, Mathiesen CK, Meuleman P, Serre SB, Lademann JB, Ghanem L, Scheel TK, Leroux-Roels G, Bukh J (2011) Development and application of hepatitis C reporter viruses with genotype 1 to 7 core-nonstructural protein 2 (NS2) expressing fluorescent proteins or luciferase in modified JFH1 NS5A. *J Virol* **85**: 8913-8928
- Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, Lademann JB, 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 JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, 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, Hanson HL, Rice CM (2001) Bad time for Bonzo? Experimental models of hepatitis C virus infection, replication, and pathogenesis. *Hepatology* **33**: 489-495

- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM (1993a) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10583-10587
- Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM (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 SM, Rice CM (1993b) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* **67**: 1385-1395
- Green KJ, Bohringer M, Gocken T, Jones JC (2005) Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* **70**: 143-202
- Green KJ, Gaudry CA (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 208-216
- Gretton SN, Taylor AI, McLauchlan J (2005) Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* **86**: 1415-1421
- 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 SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ (2004) A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* **85**: 451-461
- Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP, Meininger V, Rouleau GA, Julien JP (2004) A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **279**: 45951-45956
- Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR (2000) Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* **181**: 1528-1536
- Haas JE, Palmer NF, Weinberg AG, Beckwith JB (1981) Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney. A distinctive renal tumor of children. *Hum Pathol* **12**: 646-657
- Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F (2009) GI-5005, a yeast vector vaccine expressing an NS3-core fusion protein for chronic HCV infection. *Curr Opin Mol Ther* **11**: 456-462
- Haid S, Pietschmann T, Pecheur EI (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 MM, 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
- Harada M, Kumemura H, Omary MB, Kawaguchi T, Maeyama N, Hanada S, Taniguchi E, Koga H, Saganuma T, Ueno T, Sata M (2003) Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus. *Exp Cell Res* **288**: 60-69
- Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA (2010) Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **285**: 21092-21102
- Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K, Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P, McKeating JA (2008) CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**: 5007-5020
- Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, Roquemore EP, Snow DM, Kreppel LK, Cole RN, et al. (1995) O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv Exp Med Biol* **376**: 115-123
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**: 1017-1022
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* **149**: 209-222
- Hatzfeld M, Weber K (1990) The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J Cell Biol* **110**: 1199-1210
- He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH (1987) Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* **156**: 636-640
- Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL (1990) Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* **62**: 447-456
- Helle F, Dubuisson J (2008) Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **65**: 100-112
- Helle F, Goffard A, Morel V, Duverlie G, McKeating J, Keck ZY, 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

- Herrmann H, Aebi U (1998) Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 177-185
- Herrmann H, Aebi U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 79-90
- Herrmann H, Haner M, Brettel M, Ku NO, Aebi U (1999) Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol* **286**: 1403-1420
- Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* **119**: 1772-1783
- 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, Mizuno K, Rikihisa T, Shimizu YK, Iwamoto A, Nakajima N, Yoshikura H (1995) Selective transmission of hepatitis C virus in vivo and in vitro. *Arch Virol* **140**: 1623-1628
- 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, Shimizu YK, Kato H, Iwamoto A, Shih JW, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H (1993b) Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* **67**: 1953-1958
- Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar MT, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N (2011) Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed Res* **32**: 143-150
- Hoffmann RM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwiebel FM, Jung MC, Scholz S, Nitschko H, Riethmuller G, Pape GR (1995) Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* **21**: 632-638
- Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Stevens CE, Peters RL, Weiner JM, Werch JB, Lander JJ (1978) Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* **10**: 60-68
- Honda M, Brown EA, Lemon SM (1996) 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
- Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**: S21-29

- Hope RG, McLauchlan J (2000) Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* **81**: 1913-1925
- Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N (2003) Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *J Biol Chem* **278**: 28562-28571
- Houghton M (2000) Strategies and prospects for vaccination against the hepatitis C viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**: 327-339
- Hourioux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, Moreau A, Trassard S, Giraudeau B, Roingeard P (2007) The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* **56**: 1302-1308
- Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**: 753-758
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA (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 DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., Ye J (2007a) 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 SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE (2005) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**: 36417-36428
- Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan SL (2007b) Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* **364**: 1-9
- Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**: 70-81
- Hyder CL, Isoniemi KO, Torvaldson ES, Eriksson JE (2011) Insights into intermediate filament regulation from development to ageing. *J Cell Sci* **124**: 1363-1372
- Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM (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
- Inagaki M, Inagaki N, Takahashi T, Takai Y (1997) Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *J Biochem* **121**: 407-414

- Inoue S, Salmon ED (1995) Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell* **6**: 1619-1640
- Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S (2009) Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* **31**: 399-409
- Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohora K, Fujita N, Ikoma J, Adachi Y, Watanabe S (2001) Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol Res* **20**: 335-347
- Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K (1996) Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* **77** (Pt 5): 1043-1054
- Ivashkina N, Wolk B, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, 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
- Jackel-Cram C, Babiuk LA, Liu Q (2007) Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core. *J Hepatol* **46**: 999-1008
- Jaquemar D, Kupriyanov S, Wankell M, Avis J, Benirschke K, Baribault H, Oshima RG (2003) Keratin 8 protection of placental barrier function. *J Cell Biol* **161**: 749-756
- Jensen TB, Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, 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
- Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16990-16995
- 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
- 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
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**: 1883-1898
- Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**: 8374-8383
- Jones CT, Patkar CG, Kuhn RJ (2005) Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* **331**: 247-259

Jones DM, Atoom AM, Zhang X, Kottlilil S, Russell RS (2011) A Genetic Interaction between the Core and Ns3 Proteins of Hepatitis C Virus Is Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol*

Jones DM, Patel AH, 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

Kaito M, Watanabe S, Tanaka H, Fujita N, Konishi M, Iwasa M, Kobayashi Y, Gabazza EC, 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

Kalamvoki M, Georgopoulou U, Mavromara P (2006) The NS5A protein of the hepatitis C virus genotype 1a is cleaved by caspases to produce C-terminal-truncated forms of the protein that reside mainly in the cytosol. *J Biol Chem* **281**: 13449-13462

Kalinina O, Norder H, Magnius LO (2004) Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J Gen Virol* **85**: 1853-1857

Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO (2002) A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* **76**: 4034-4043

Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Engel J, Aebi U, Steinmetz MO (1998) An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13419-13424

Kanda T, Steele R, Ray R, Ray RB (2007) Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol* **81**: 669-676

Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, Hijikata M, Asabe S, Kimura K, Shimotohno K (1994) Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 320-326

Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV (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, Ikeda M, Mizutani T, Sugiyama K, Noguchi M, Hirohashi S, Shimotohno K (1996) Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplastic human hepatocytes. *Jpn J Cancer Res* **87**: 787-792

Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K (1995) Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 863-869

- 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 RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ (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
- Keck ZY, Xia J, Cai Z, Li TK, Owsianka AM, Patel AH, Luo G, Fong SK (2007) Immunogenic and functional organization of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E2 on infectious HCV virions. *J Virol* **81**: 1043-1047
- Khattab MA (2009) Targeting host factors: a novel rationale for the management of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* **15**: 3472-3479
- Kim DW, Gwack Y, Han JH, 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 JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR (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 K, Kim KH, Ha E, Park JY, 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 S, Wong P, Coulombe PA (2006) A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* **441**: 362-365
- Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW (2004) Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**: 50031-50041
- Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK (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
- King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* **20**: 3282-3291

- Kirmse R, Portet S, Mucke N, Aebi U, Herrmann H, Langowski J (2007) A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem* **282**: 18563-18572
- Klein KC, Dellos SR, Lingappa JR (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
- Kneteman NM, Weiner AJ, O'Connell J, Collett M, Gao T, Aukerman L, Kovelsky R, Ni ZJ, Zhu Q, Hashash A, Kline J, Hsi B, Schiller D, Douglas D, Tyrrell DL, Mercer DF (2006) Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* **43**: 1346-1353
- Kobayashi M, Bennett MC, Bercot T, Singh IR (2006) Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol* **80**: 1817-1825
- Koch JO, Bartenschlager R (1999) Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* **73**: 7138-7146
- Kohaar I, Ploss A, Korol E, Mu K, Schoggins JW, O'Brien TR, Rice CM, Prokunina-Olsson L (2010) Splicing diversity of the human OCLN gene and its biological significance for hepatitis C virus entry. *J Virol* **84**: 6987-6994
- Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Izumi T, Ohta S, Taguchi T, Suita S, Tsuneyoshi M (2007) Highly aggressive behavior of malignant rhabdoid tumor: a special reference to SMARCB1/INI1 gene alterations using molecular genetic analysis including quantitative real-time PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**: 817-824
- Koike K, Moriya K, Matsuura Y (2010) Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* **40**: 69-82
- Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**: 570-574
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**: 3363-3371
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (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
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**: 524-530
- Kosako H, Goto H, Yanagida M, Matsuzawa K, Fujita M, Tomono Y, Okigaki T, Odai H, Kaibuchi K, Inagaki M (1999) Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. *Oncogene* **18**: 2783-2788

- 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
- 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 SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, Mee C, Soulier E, Royer C, Lambotin M, Grunert F, Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL, McKeating JA, Schuster C, Baumert TF (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
- Ku NO, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keeffe EB, Sibley RK, Lee YM, Wright TL, Omary MB (2003) Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6063-6068
- Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB (2001) Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med* **344**: 1580-1587
- Ku NO, Michie S, Oshima RG, Omary MB (1995) Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J Cell Biol* **131**: 1303-1314
- Ku NO, Toivola DM, Strnad P, Omary MB (2010) Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury. *Nat Cell Biol* **12**: 876-885
- Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB (1999) The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* **277**: G1108-1137
- Kuang WF, Lin YC, Jean F, Huang YW, Tai CL, Chen DS, Chen PJ, Hwang LH (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 SM, Watowich SJ (2001) Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* **75**: 2119-2129
- Lagging LM, Meyer K, Owens RJ, Ray R (1998) Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol* **72**: 3539-3546

- Lai CK, Jeng KS, Machida K, Lai MM (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 ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgillis S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P (1994) Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* **343**: 388-390
- 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
- Lane EB, Goodman SL, Trejdosiewicz LK (1982) Disruption of the keratin filament network during epithelial cell division. *EMBO J* **1**: 1365-1372
- Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR (1994) Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* **202**: 606-614
- Lang CA, Conrad S, Garrett L, Battistutta D, Cooksley WG, Dunne MP, Macdonald GA (2006) Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection. *J Pain Symptom Manage* **31**: 335-344
- Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z (2002) Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* **35**: 1002-1009
- 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 FL, Penin F, Pecheur EI (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 JM, Cosset FL (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 EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL (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 AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, Dubuisson J, Ball JK, Cosset FL (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 AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR (2008) Broadly

neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**: 25-27

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD (2000) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**: 1499-1512

Lee C, Ma H, Hang JQ, Leveque V, Sklan EH, Elazar M, Klumpp K, Glenn JS (2011) The hepatitis C virus NS5A inhibitor (BMS-790052) alters the subcellular localization of the NS5A non-structural viral protein. *Virology* **414**: 10-18

Lee WM, Dienstag JL, Lindsay KL, Lok AS, Bonkovsky HL, Shiffman ML, Everson GT, Di Bisceglie AM, Morgan TR, Ghany MG, Morishima C, Wright EC, Everhart JE (2004) Evolution of the HALT-C Trial: pegylated interferon as maintenance therapy for chronic hepatitis C in previous interferon nonresponders. *Control Clin Trials* **25**: 472-492

Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J (2007) New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* **81**: 4357-4362

Lehmann M, Meyer MF, Monazahian M, Tillmann HL, Manns MP, Wedemeyer H (2004) High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *J Med Virol* **73**: 387-391

Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M (2007) *Hepatitis C Virus*, Vol. 1, Philadelphia.

Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC (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 K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr., Lemon SM (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 XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ (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 BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM (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

Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**: 623-626

Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM (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 BD, Pragai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM (2007) The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol* **81**: 8905-8918
- Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**: 933-938
- Liu Q, Bhat RA, Prince AM, Zhang P (1999) The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 572-577
- Liu S, Ansari IH, Das SC, Pattnaik AK (2006) Insertion and deletion analyses identify regions of non-structural protein 5A of Hepatitis C virus that are dispensable for viral genome replication. *J Gen Virol* **87**: 323-327
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T (2009) 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
- Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH (1995) Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* **213**: 455-461
- Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH (1994) Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* **199**: 124-131
- Lo SY, Selby MJ, Ou JH (1996) Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* **70**: 5177-5182
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA (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
- Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, Carney DS, Wang T, Ishida H, Yoneyama M, Fujita T, Saito T, Lee WM, Hagedorn CH, Lau DT, Weinman SA, Lemon SM, Gale M, Jr. (2006) Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6001-6006
- Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**: 831-835

- Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, 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
- Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R (2004) C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* **279**: 32035-32045
- Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foung S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **278**: 20358-20366
- Lu X, Lane EB (1990) Retrovirus-mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: specific domain functions in keratin stabilization and filament formation. *Cell* **62**: 681-696
- Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth P, Jr., Dwek RA, Biggin PC, 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, Lindstrom H, Gronwall C, Persson MA (2006) Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* **87**: 3263-3272
- Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA (2003) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* **77**: 5428-5438
- Luo G, Xin S, Cai Z (2003) Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**: 3312-3318
- Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, 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* **85**: 86-97
- Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M (2008) NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**: 7624-7639
- Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ (2008) Acute hepatitis C. *Lancet* **372**: 321-332
- Mallory F (1911) Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **22**: 69-75
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**: 1350-1359
- Marcellin P, Gish RG, Gitlin N, Heise J, Halliman DG, Chun E, Rodriguez-Torres M (2010) Safety and efficacy of viremivir versus ribavirin in ViSER2: randomized, double-blind study in therapy-naive hepatitis C patients. *J Hepatol* **52**: 32-38

- Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, Coste J, Izopet J, Duverlie G, Payan C, Pawlotsky JM, Defer C, Bogard M, Gerolami V, Halfon P, Buisson Y, Fouqueray B, Loiseau P, Lamoril J, Lefrere JJ, 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
- Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T (2001) Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**: 263-275
- Maurin G, Fresquet J, Granio O, Wychowski C, Cosset FL, Lavillette D (2011) Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. *J Biol Chem* **286**: 23865-23876
- Mayer RJ, Lowe J, Lennox G, Doherty F, Landon M (1989) Intermediate filaments and ubiquitin: a new thread in the understanding of chronic neurodegenerative diseases. *Prog Clin Biol Res* **317**: 809-818
- McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, Terrault NA, Jacobson IM, Afdhal NH, Heathcote EJ, Zeuzem S, Reesink HW, Garg J, Bsharat M, George S, Kauffman RS, Adda N, Di Bisceglie AM (2010) Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* **362**: 1292-1303
- McLauchlan J (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **7**: 2-14
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**: 3980-3988
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM (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 PL, Dow BC, Follett EA, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, 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
- Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* **82**: 3555-3560
- 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 EC, Jarvis LM, Yap PL, 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 DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**: 927-933
- Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* **67**: 37-46
- Meuleman P, Bukh J, Verhoye L, Farhoudi A, Vanwolleghem T, Wang RY, Desombere I, Alter H, Purcell RH, Leroux-Roels G (2011) In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* **53**: 755-762
- 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 JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, 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 JC, 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
- 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
- Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, 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
- Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating J, Maurel P, Fournier-Wirth C (2008) Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* **82**: 569-574
- Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* **129**: 705-733

- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**: 11-24
- Moll R, Schiller DL, Franke WW (1990) Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* **111**: 567-580
- Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, 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 MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, Lindenbach BD, Rice CM (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, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**: 453-463
- Morel V, Descamps V, Francois C, Fournier C, Brochet E, Capron D, Duverlie G, Castelain S (2010) Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. *J Clin Virol* **47**: 382-386
- Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V, Bentata M, Jarrousse B, Lortholary O, Pallier C, Deny P (2001) Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J Gen Virol* **82**: 1001-1012
- Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Wakita T (2007) The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* **79**: 714-723
- Mousseau G, Kota S, Takahashi V, Frick DN, Strosberg AD (2010) Dimerization-driven interaction of hepatitis C virus core protein with NS3 helicase. *J Gen Virol* **92**: 101-111
- Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L (1993) Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* **74** (Pt 4): 669-676
- Munoz-Marmol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E (1998) A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11312-11317
- 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

- Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T (2007) The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* **81**: 8030-8040
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858-3863
- Nakamichi I, Toivola DM, Strnad P, Michie SA, Oshima RG, Baribault H, Omary MB (2005) Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation. *J Cell Biol* **171**: 931-937
- Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U (2006) Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* **55**: 869-877
- 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
- Negro F, Alberti A (2011) The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int* **31 Suppl 2**: 1-3
- Nelson DR, Benhamou Y, Chuang WL, Lawitz EJ, Rodriguez-Torres M, Flisiak R, Rasenack JW, Kryczka W, Lee CM, Bain VG, Pianko S, Patel K, Cronin PW, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG (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
- Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R (2005) T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* **32**: 75-85
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**: 103-107
- Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S (2006) Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* **354**: 58-68
- Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL (2006) Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* **80**: 7569-7577
- North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Hatzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR (1999) Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci* **112 (Pt 23)**: 4325-4336

- Nousbaum J, Polyak SJ, Ray SC, Sullivan DG, Larson AM, Carithers RL, Jr., Gretch DR (2000) Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* **74**: 9028-9038
- 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
- Omary MB (2009) "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest* **119**: 1756-1762
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* **351**: 2087-2100
- Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D (1998) Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* **31**: 105-140
- Omary MB, Ku NO, Strnad P, Hanada S (2009) Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J Clin Invest* **119**: 1794-1805
- Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J (2006) "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* **31**: 383-394
- Omary MB, Ku NO, Toivola DM (2002) Keratins: guardians of the liver. *Hepatology* **35**: 251-257
- 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
- Oriolo AS, Wald FA, Canessa G, Salas PJ (2007) GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**: 781-794
- Oshima RG (2007) Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res* **313**: 1981-1994
- Otto GA, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**: 369-380
- Pang PS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM (2002) The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**: 1168-1176
- Parry DA (2005) Microdissection of the sequence and structure of intermediate filament chains. *Adv Protein Chem* **70**: 113-142
- Parry DA, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H (2007) Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res* **313**: 2204-2216

- Patel H, Heathcote EJ (2011) Sustained virological response with 29 days of Debio 025 monotherapy in hepatitis C virus genotype 3. *Gut* **60**: 879
- Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, Bartenschlager R (2011) NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J Virol* **85**: 6963-6976
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, 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 JM (2003) Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* **7**: 45-66
- Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM (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
- Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39**: 5-19
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, Patel AH, Meisel H, Baumert J, Viazov S, Rispeter K, Blum HE, Roggendorf M, Baumert TF (2007) Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6025-6030
- Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**: 67-83
- Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, Jr., Wang C, Ware F, Sodora DL, 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 RK, Peters C, Lorenz IC, Lindenbach BD (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
- Phua DC, Humbert PO, Hunziker W (2009) Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. *Mol Biol Cell* **20**: 2841-2855
- Piccininni S, Varaklioti A, Nardelli M, Dave B, Raney KD, McCarthy JE (2002) Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem* **277**: 45670-45679
- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, 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, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R (2001) Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* **75**: 1252-1264

Pietschmann T, Zayas M, Meuleman P, Long G, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Leroux-Roels G, Lohmann V, Bartenschlager R (2009) Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog* **5**: e1000475

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

Pillonel J, Laperche S (2005) Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill* **10**: 5-8

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**: 882-886

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**: 3867-3874

Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Heliot L, Rouille Y, Dubuisson J (2011) NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**: e1001278

Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, Haber PS, Marinos G, Levy MH, Kaldor JM, Dolan KA, Ffrench RA, Lloyd AR, Rawlinson WD (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

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL (2003) Viral hepatitis C. *Lancet* **362**: 2095-2100

Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ (1974) Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* **2**: 241-246

Pringle CR (1999) Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch Virol* **144**: 421-429

Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE (2010) Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* **285**: 22725-22731

- Ray MB (1987) Distribution patterns of cytokeratin antigen determinants in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Hum Pathol* **18**: 61-66
- Rebibo D, Danic B (2007) [Haemovigilance donors: methods and results]. *Transfus Clin Biol* **14**: 142-146
- Reed KE, Rice CM (2000) Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**: 55-84
- Rijnbrand RC, Lemon SM (2000) Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**: 85-116
- 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
- Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S, Pezzanera M, Ercole BB, McKeating J, Yagnik A, Lahm A, Tramontano A, Cortese R, Nicosia A (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* **77**: 1856-1867
- Rocha-Perugini V, Lavie M, Delgrange D, Canton J, Pillez A, Potel J, Lecoecur C, Rubinstein E, Dubuisson J, Wychowski C, Cocquerel L (2009) The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* **9**: 111
- 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
- Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M (2004) Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* **96**: 103-108
- Roohvand F, Maillard P, Lavergne JP, 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
- Ross JL, Ali MY, Warshaw DM (2008) Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 41-47
- Rothnagel JA, Dominey AM, Dempsey LD, Longley MA, Greenhalgh DA, Gagne TA, Huber M, Frenk E, Hohl D, Roop DR (1992) Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. *Science* **257**: 1128-1130
- Rotty JD, Hart GW, Coulombe PA (2010) Stressing the role of O-GlcNAc: linking cell survival to keratin modification. *Nat Cell Biol* **12**: 847-849

- Rouille Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, 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
- Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Traubad MA, Bizollon T, Guillat C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspe G, Trepo C (1999) Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* **80** (Pt 11): 3007-3018
- Saito T, Owen DM, 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 MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, 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
- Sandrin V, Boulanger P, Penin F, Granier C, Cosset FL, 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
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, 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 TK, Gottwein JM, Carlsen TH, Li YP, Jensen TB, Spengler U, Weis N, Bukh J (2011) Efficient culture adaptation of hepatitis C virus recombinants with genotype-specific core-NS2 by using previously identified mutations. *J Virol* **85**: 2891-2906
- Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, 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
- Schiff ER (2007) Emerging strategies for pegylated interferon combination therapy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **4 Suppl 1**: S17-21
- Schmidt-Mende J, Bieck E, Hogle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2001) Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**: 44052-44063

- Schmidt A, Heid HW, Schafer S, Nuber UA, Zimbelmann R, Franke WW (1994) Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur J Cell Biol* **65**: 229-245
- Schmitt M, Scrima N, Radujkovic D, Caillet-Saguy C, Simister PC, Friebe P, Wicht O, Klein R, Bartenschlager R, Lohmann V, Bressanelli S (2011) A comprehensive structure-function comparison of hepatitis C virus strain JFH1 and J6 polymerases reveals a key residue stimulating replication in cell culture across genotypes. *J Virol* **85**: 2565-2581
- Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N (2009) Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5342-5347
- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* **174**: 169-174
- Seipp S, Mueller HM, Pfaff E, Stremmel W, Theilmann L, Goeser T (1997) Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol* **78** (Pt 10): 2467-2476
- Serebrov V, Pyle AM (2004) Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* **430**: 476-480
- 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
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**: 558-567
- Shi J, Sugrue SP (2000) Dissection of protein linkage between keratins and pinin, a protein with dual location at desmosome-intermediate filament complex and in the nucleus. *J Biol Chem* **275**: 14910-14915
- Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, 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
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H (1998) Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol* **79** (Pt 6): 1383-1386
- Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H (1992) Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5477-5481
- Shiratsuchi H, Oshiro Y, Saito T, Itakura E, Kinoshita Y, Tamiya S, Oda Y, Komiyama S, Tsuneyoshi M (2001) Cytokeratin subunits of inclusion bodies in rhabdoid cells:

immunohistochemical and clinicopathological study of malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma. *Int J Surg Pathol* **9**: 37-48

Shiratsuchi H, Saito T, Sakamoto A, Itakura E, Tamiya S, Oshiro Y, Oda Y, Toh S, Komiyama S, Tsuneyoshi M (2002) Mutation analysis of human cytokeratin 8 gene in malignant rhabdoid tumor: a possible association with intracytoplasmic inclusion body formation. *Mod Pathol* **15**: 146-153

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

Simister P, Schmitt M, Geitmann M, Wicht O, Danielson UH, Klein R, Bressanelli S, Lohmann V (2009) Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *J Virol* **83**: 11926-11939

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**: 962-973

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS (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

Slater-Handshy T, Droll DA, Fan X, Di Bisceglie AM, Chambers TJ (2004) HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology* **319**: 36-48

Smith EA, Fuchs E (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* **141**: 1229-1241

Snider J, Lin F, Zahedi N, Rodionov V, Yu CC, Gross SP (2004) Intracellular actin-based transport: how far you go depends on how often you switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13204-13209

Snider NT, Weerasinghe SV, Iniguez-Lluhi JA, Herrmann H, Omary MB (2010) Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation. *J Biol Chem* **286**: 2273-2284

Song S, Landsbury A, Dahm R, Liu Y, Zhang Q, Quinlan RA (2009) Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest* **119**: 1837-1848

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

Spillmann D (2001) Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* **83**: 811-817

- Srikanth B, Vaidya MM, Kalraiya RD (2010) O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J Biol Chem* **285**: 34062-34071
- Stapleford KA, Lindenbach BD (2011) Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* **85**: 1706-1717
- Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P (2010) The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* **92**: 233-246
- Stappenbeck TS, Green KJ (1992) The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. *J Cell Biol* **116**: 1197-1209
- Steinbock FA, Nikolic B, Coulombe PA, Fuchs E, Traub P, Wiche G (2000) Dose-dependent linkage, assembly inhibition and disassembly of vimentin and cytokeratin 5/14 filaments through plectin's intermediate filament-binding domain. *J Cell Sci* **113** (Pt 3): 483-491
- Steinert PM (1990) The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer. *J Biol Chem* **265**: 8766-8774
- Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T (2007) Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**: e103
- Steinmetz MO, Stock A, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Faix J, Gerisch G, Aebi U, Kammerer RA (1998) A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I. *EMBO J* **17**: 1883-1891
- Strnad P, Lienau TC, Tao GZ, Lazzeroni LC, Stickel F, Schuppan D, Omary MB (2006) Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection. *Hepatology* **43**: 1354-1363
- Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, 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 T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T (2007) Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* **42**: 411-423
- Svitkina TM, Verkhovskiy AB, Borisy GG (1996) Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **135**: 991-1007
- Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB (2008) The Human Intermediate Filament

Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat* **29**: 351-360

Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* **70**: 8477-8484

Takahashi K, Paladini RD, Coulombe PA (1995) Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly related type II keratin 6 isoforms. *J Biol Chem* **270**: 18581-18592

Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, 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

Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O (2011) Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Inhibits Lipopolysaccharide-Mediated Apoptosis of Hepatocytes by Decreasing Expression of Toll-Like Receptor 4. *J Infect Dis* **204**: 793-801

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K (1996) Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**: 3307-3312

Tao GZ, Looi KS, Toivola DM, Strnad P, Zhou Q, Liao J, Wei Y, Habtezion A, Omary MB (2009) Keratins modulate the shape and function of hepatocyte mitochondria: a mechanism for protection from apoptosis. *J Cell Sci* **122**: 3851-3855

Taraporewala ZF, Patton JT (2004) Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* **101**: 57-66

Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J (2008) Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **82**: 2182-2195

Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J (2008a) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000032

Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM (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 TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM (2004) The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* **279**: 48576-48587

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**: 374-379

Tews BA, 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, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**: 1395-1406
- Thompson AA, Zou A, Yan J, Duggal R, Hao W, Molina D, Cronin CN, Wells PA (2009) Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry* **48**: 906-916
- Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA (2008) Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**: 17-24
- Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB (2010) Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol* **20**: 79-91
- Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H (2011) Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Hepatol* **54**: 1273-1285
- Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M, Soudeyns H (2006) Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* **352**: 357-367
- Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**: 1734-1741
- Tseng CT, Klimpel GR (2002) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* **195**: 43-49
- Tsokos M, Kouraklis G, Chandra RS, Bhagavan BS, Triche TJ (1989) Malignant rhabdoid tumor of the kidney and soft tissues. Evidence for a diverse morphological and immunocytochemical phenotype. *Arch Pathol Lab Med* **113**: 115-120
- 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
- Vanwolleghem T, Bukh J, Meuleman P, Desombere I, Meunier JC, Alter H, Purcell RH, 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
- Vaquer P, Canet R, Llombart A, Riera J, Obrador A, Gaya J (1994) Histological evolution of chronic hepatitis C. Factors related to progression. *Liver* **14**: 265-269
- 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

Vermehren J, Sarrazin C (2010) New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect* **17**: 122-134

Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**: 203-206

Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J (2010) Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* **84**: 10159-10168

Virtanen I, Lehto VP, Kurki P, Miettinen A, Linder E, Stenman S (1979) Intermediate filaments in hyaline material in alcoholic liver disease (Mallory bodies) and in cultured hepatoma cells. *Virchows Arch B Cell Pathol* **29**: 363-367

Vo NV, Young KC, Lai MM (2003) Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**: 10462-10471

Vogel AM, Gown AM, Caughlan J, Haas JE, Beckwith JB (1984) Rhabdoid tumors of the kidney contain mesenchymal specific and epithelial specific intermediate filament proteins. *Lab Invest* **50**: 232-238

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 FL, 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 JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA (2007) Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132**: 667-678

Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, Grove J, Brimacombe C, McKeating JA, Pecheur EI, Graf TN, Oberlies NH, Lohmann V, Cao F, Tavis JE, Polyak SJ (2010) Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* **51**: 1912-1921

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791-796

- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* **7**: 710-721
- 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 J, Tong W, Zhang X, Chen L, Yi Z, Pan T, Hu Y, Xiang L, Yuan Z (2006) Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett* **580**: 4392-4400
- Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, 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 Y, Xu Y, Tong W, Pan T, Li J, Sun S, Shao J, Ding H, Toyoda T, Yuan Z (2011) Hepatitis C virus NS5B delays S-phase progression in human hepatocyte-derived cells by relocalizing the cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP). *J Biol Chem*
- Wanless IR, Lentz JS (1990) Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* **12**: 1106-1110
- Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P (2002) Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* **128**: 195-203
- 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
- Waxman L, Whitney M, Pollok BA, Kuo LC, Darke PL (2001) Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13931-13935
- Wedemeyer H, Schuller E, Schlaphoff V, Stauber RE, Wiegand J, Schiefke I, Firbas C, Jilma B, Thursz M, Zeuzem S, Hofmann WP, Hinrichsen H, Tauber E, Manns MP, Klade CS (2009) Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *Vaccine* **27**: 5142-5151
- Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, 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
- Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW (2004) O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J Biol Chem* **279**: 38466-38470
- Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A (1996) Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* **24**: 100-111
- Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, 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 KC, Bryan JT, Morasso MI, Jang SI, Lee JH, Yang JM, Marekov LN, Parry DA, Steinert PM (2000) Coiled-coil trigger motifs in the 1B and 2B rod domain segments are required for the stability of keratin intermediate filaments. *Mol Biol Cell* **11**: 3539-3558
- Wunschmann S, Muller HM, Stipp CS, Hemler ME, Stapleton JT (2006) In vitro interaction between hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. *J Infect Dis* **194**: 1058-1067
- Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**: 3840-3848
- Yagnik AT, Lahm A, Meola A, Roccasecca RM, Ercole BB, Nicosia A, Tramontano A (2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* **40**: 355-366
- Yamaga AK, Ou JH (2002) Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* **277**: 33228-33234
- Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, 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
- Yang W, Qiu C, Biswas N, Jin J, Watkins SC, Montelaro RC, Coyne CB, 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
- Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K (1996) The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23**: 1334-1340
- Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, Weber PC (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* **4**: 463-467
- Yazdanpanah Y, De Carli G, Miguères B, Lot F, Campins M, Colombo C, Thomas T, Deuffic-Burban S, Prevot MH, Domart M, Tarantola A, Abiteboul D, Deny P, Pol S, Desenclos JC, 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 SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**: 3557-3568
- Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM (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 SM (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 RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM (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 JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Reherrmann B (2009) Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* **49**: 12-21
- You S, Rice CM (2008) 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J Virol* **82**: 184-195
- Yu GY, Lee KJ, Gao L, Lai MM (2006) Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* **80**: 6013-6023
- Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB (2007) From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp Cell Res* **313**: 2033-2049
- Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW (2000) Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol* **156**: 1263-1274
- Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF (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 EM, Benhamou Y, Pianko S, Bain VG, Shouval D, Flisiak R, Rehak V, Grigorescu M, Kaita K, Cronin PW, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG (2008) Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* **48**: 407-417
- Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA (2004a) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* **78**: 1448-1455
- 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 CG, Mihalik K, Virata-Theimer ML, Yu MY, Alter HJ, Feinstone SM (2007) Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8449-8454
- Zhao W, Liao GY, Jiang YJ, Jiang SD (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 DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9294-9299

Zhu H, Briggs JM (2011) Mechanistic role of NS4A and substrate in the activation of HCV NS3 protease. *Proteins* **79**: 2428-2443

Résumé

Le virus de l'hépatite C (HCV) est un problème majeur de santé publique. On estime en effet que près de 3% de la population mondiale est infectée par ce pathogène qui se caractérise entre autre par sa grande variabilité génotypique. Les différentes souches de HCV ont été classées parmi six génotypes majeurs, eux même subdivisés en de nombreux sous-types. Toutes les souches de HCV n'ont pas la même capacité, comme JFH1 (génotype 2a), à se propager efficacement en culture cellulaire ce qui limite l'analyse des particules virales.

Pour pallier la difficulté d'étudier le HCV de génotype 1a, des chimères inter génotypiques présentant les caractéristiques structurales du HCV de génotype 1a mais possédant le pouvoir réplicatif exceptionnel de l'isolat JFH1 (génotype 2a) ont été produites. Celles ci ont été adaptées à la culture cellulaire et plusieurs mutations d'adaptation ont été identifiées. L'importance de la protéine NS5 dans la formation des particules virales infectieuses ayant été également prouvée, cela nous a conduit à générer d'autres chimères pour lesquelles les séquences codant la protéine NS5A de JFH1 étaient substituées par celles de la souche H77, nous rapprochant ainsi du HCV de génotype 1a. Cela nous a permis d'identifier d'autres mutations d'adaptation pour ces chimères, permettant ainsi d'améliorer leur infectiosité en culture cellulaire.

Par ailleurs, nous avons caractérisé une structure inédite présente au sein d'un clone de cellules d'hépatocytes (Huh-7w7.3) qui avait été sélectionné au cours d'une étude pour analyser le passage cellule à cellule des particules virales. Cette structure que nous avons dénommé SB pour « spheroid body » présente un enroulement des kératines 8 et 18 (K8/K18) emprisonné dans une cage de vimentine. Cette structure pouvant être assimilée à des inclusions cytoplasmiques, nous avons cherché alors à mieux la caractériser. Au cours de la division cellulaire nous avons remarqué que cette structure se désassemble et se réassemble pour ne recréer qu'un seul SB par cellule. Toutes nos analyses ont démontré que le SB n'est pas assimilable aux corps de Mallory (MDB) qui représentent des agrégats dans les hépatocytes. Par ailleurs, aucune mutation n'a été identifiée dans la séquence primaire des protéines K8, K18 et vimentine provenant des cellules Huh-7 et Huh-7w7.3. Cependant l'expression d'une GFP-K18 dans ces dernières conduisait à l'enroulement des filaments de kératines, contrairement à ce qui était observé dans les cellules Huh-7. En conclusion, nous avons isolé un clone cellulaire présentant un corps intra cytoplasmique tout à fait inédit impliquant des facteurs cellulaires présents dans la cellule Huh-7w7.3 et non dans celle de Huh-7.

Abstract

Hepatitis C Virus is a major public health problem, around 3% of the world population is estimated to be infected by this pathogen which is characterized by a great genotypic variability. The HCV strains have been classified within six major genotypes, subdivided in numerous subtypes. However all HCV genotypes are not able to spread efficiently in cell culture as JFH1 (HCV genotype 2a).

In order to analyse the HCV viral particles of genotype 1a, inter genotypic chimeras having the structural characteristics of HCV genotype 1a but the replicative power of JFH-1 (genotype 2a) were produced. These chimeric viruses were adapted to the cell culture and several mutations have been identified. Furthermore, the NS5A protein has been described to be important for infectious viral particle formation. This lead us to generate chimeric viruses where the sequence coding for JFH1 NS5A protein was replaced by the corresponding sequence of H77 strain. We identified a new group of mutations in the adapted viruses, allowing to increase their infectivity in cell culture.

Furthermore, a cellular clone containing an intracytoplasmic body was isolated from hepatocyte cell culture (Huh-7w7.3). This structure was named SB for "spheroid body", and the keratins 8 and 18 (K8/K18), which formed the central core of the SB were surrounded by a vimentin cage-like structure. We examined whether this body could be related to some intracytoplasmic inclusions. During cytokinesis, the SB was disassembled and reassembled in a way to reconstitute a unique SB in each progeny cell. All our analyses indicate the SB is not related to Mallory-Denk body, a well characterized intracytoplasmic inclusion. Moreover, the structure of SB was not due to mutations in the primary sequence of K8/K18 and vimentin. However GFP-K18 expression leads to typical cytoplasmic whorls of intermediate filaments only in Huh-7w7.3 cells. In the present study, we have isolated a cellular hepatocytic clone containing an unusual cytoplasmic keratin-rich spheroid body involving cellular factors in the process of spheroid body formation.