

RESUME

L'infection par le virus de l'hépatite C représente un problème majeur de santé publique. La prévalence dans la population mondiale serait de 0,5 % à 1 %. L'infection peut se manifester par une hépatite aiguë, une hépatite chronique qui peut dégénérer en cirrhose ou en carcinome hépatocellulaire (plus de 5% des cas). Bien que l'agent infectieux soit cloné depuis 1989, il est actuellement difficile de le propager en culture cellulaire.

Par analogie avec la plupart des protéines exposées à la surface des virus, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 jouent probablement un rôle important dans l'infection virale en étant responsables de l'interaction du virus avec son ou ses récepteurs à la surface des cellules cibles, ces protéines sont également importantes pour l'immunogénicité virale. L'étude de la maturation et de l'expression des protéines E1 et E2, tout comme leur interaction et leur assemblage est donc nécessaire pour une meilleure compréhension du cycle viral et de la pathogénèse du VHC.

Dans un premier temps, les mécanismes de la rétention des protéines E1 et E2, ainsi que du complexe E1E2 à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) ont été explorés. Il a été montré que le complexe formé par les glycoprotéines E1 et E2 comprend des signaux de rétention dans le RE, portés par les domaines transmembranaires respectifs de ces deux protéines. Ces domaines transmembranaires sont situés respectivement pour les protéines E1 et E2, entre les acides aminés 353 et 384 pour l'un et 718 et 747 pour l'autre.

En second lieu, nous avons identifié les sites potentiels de glycosylation reconnus sur la glycoprotéine E1 du virus de l'hépatite C. Nous avons montré que seul le site de glycosylation n°5 de la protéine E1 n'est pas utilisé pour l'addition d'un oligosaccharide. Puis nous avons étudié le rôle des glycannes dans le repliement et l'assemblage des glycoprotéines E1 et E2. Nous avons montré que la glycosylation sur le site n°4 de la protéine E1 est un élément déterminant pour la formation d'un complexe E1E2 natif, alors que la mutation des sites 1, 2 ou 3 n'entraîne que peu ou pas de perturbations. Les hypothèses permettant d'expliquer l'importance de la glycosylation sur le site n°4 ont été testées.

Enfin, nous avons testé la sécrétion de formes tronquées de la protéine E1, délétées leurs extrémités C-terminales. Nous avons pu mettre en évidence une forme tronquée très efficacement sécrétée.

Une meilleure compréhension des mécanismes de formation des hétérodimères matures permettrait une optimisation de leur potentiel immunogénique. De même, des formes fortement sécrétées de la protéine E1 seraient très utiles pour constituer un outil diagnostique.

Abréviations

| | |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| aa : | acide aminé |
| Ac : | Anticorps |
| bDNA : | branched DNA (ADN Branché) |
| BiP : | Binding immunoglobulin protein |
| BVDV : | Bovine viral diarrhea virus |
| cADN : | ADN complémentaire |
| C-terminale : | Carboxy-terminale |
| CD8 : | Cluster differentiation 8 |
| CMV : | Cytomégalovirus |
| endoH : | Endo- β -N-acétylglucosaminidase H. |
| ERGIC : | Endoplasmic reticulum-to-golgi intermediate compartment |
| GTP : | Guanosine triphosphate |
| HPLC : | Chromatographie liquide haute performance |
| HVRI : | Région hypervariable I |
| IFN : | Interféron |
| IgM : | Immunoglobuline M |
| IRES : | Internal ribosome entry site |
| ISDR : | Interferon sensitivity determining region |
| LTR : | Long terminal repeat |
| 3' NC : | Extrêmité 3' non-codante |
| NS3 : | Protéine non-structurale 3 |
| N-terminale : | Amino-terminale |
| PBMC : | Cellules mononuclées du sang périphérique |
| PCR : | Polymerase chain reaction |
| RE : | Réticulum endoplasmique |
| TNF : | Tumor necrosis factor |
| VHC : | Virus de l'hépatite C |
| VIH : | Virus de l'immunodéficience humaine |
| Wt : | Wild type (type sauvage) |
| YF : | Yellow fever |

SOMMAIRE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| SOMMAIRE | 1 |
| GENERALITES | 4 |
| I. Découverte du Virus de l'Hépatite C (VHC) | 5 |
| II. Epidémiologie | 5 |
| II.1. Transmission par voie parentérale..... | 6 |
| II.2. Transmission par voie sexuelle..... | 7 |
| II.3. Transmission materno-foetale..... | 8 |
| II.4. Transmission familiale..... | 8 |
| III. Diagnostic de l'hépatite C | 9 |
| III.1. Diagnostic sérologique..... | 9 |
| III.2. Diagnostic moléculaire..... | 10 |
| IV. Physiopathologie de l'hépatite C | 11 |
| IV.1. L'hépatite aiguë..... | 11 |
| IV.2. L'hépatite chronique..... | 12 |
| IV.3. La cirrhose..... | 12 |
| IV.4. Le carcinome hépato-cellulaire..... | 13 |
| IV.5. Pathologies auto-immunes associées au VHC..... | 13 |
| V. Traitement de L'hépatite C | 14 |
| VI. Le Virus de l'Hépatite C | 15 |
| VII. Le génome du VHC | 16 |
| VII.1. Les extrémités non-codantes..... | 16 |
| VII.1.1. L'extrémité 5' non-codante (5'NC)..... | 16 |
| VII.1.2. L'extrémité 3' non-codante (3'NC)..... | 17 |
| VII.2. Les protéines virales..... | 18 |
| VII.2.1. Les protéines structurales..... | 18 |
| VII.2.1.a. La protéine C..... | 18 |
| VII.2.1.b. Les protéines E1 et E2..... | 20 |
| VII.2.2. La protéine p7..... | 21 |
| VII.2.3. Les protéines non-structurales..... | 21 |
| VII.2.3.a. La protéine NS2..... | 21 |
| VII.2.3.b. La protéine NS3..... | 21 |
| VII.2.3.c. La protéine NS4A..... | 22 |
| VII.2.3.d. La protéine NS4B..... | 23 |
| VII.2.3.e. La protéine NS5A..... | 23 |
| VII.2.3.f. La protéine NS5B..... | 24 |
| VIII. Notion de variabilité génomique | 25 |
| VIII.1. Génotypes et prévalence..... | 26 |
| VIII.2. Génotype et mode de transmission..... | 26 |
| VIII.3. Influence du génotype sur plusieurs paramètres de l'infection..... | 27 |
| IX. Un vaccin contre l'hépatite C: Espoirs et difficultés | 27 |
| IX.1. Les obstacles..... | 28 |
| IX.2. Les espoirs et les stratégies..... | 28 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESULTATS-DISCUSSION | 31 |
| I. Etude des séquences de rétention à la membrane du RE des glycoprotéines E1 et E2 | 32 |
| I.1. Introduction..... | 32 |
| I.1.1. La protéine E1..... | 32 |
| I.1.2. La protéine E2..... | 33 |
| I.1.3. Interaction des protéines E1 et E2..... | 35 |
| I.1.3.a. L'anticorps H2..... | 36 |
| I.1.3.b. Le complexe E1E2..... | 36 |
| I.1.3.c. Séquences impliquées dans l'interaction des Glycoprotéines E1 et E2..... | 37 |
| I.1.4. Interaction des protéines E1 et E2 avec la calnexine..... | 39 |
| I.1.5. Notion de Contrôle de Qualité..... | 40 |
| I.1.6. Localisation subcellulaire des glycoprotéines du VHC..... | 41 |
| I.1.7. Les mécanismes de la compartimentalisation des protéines..... | 42 |
| I.1.7.a. Mécanismes de récupération..... | 42 |
| → Mécanismes dépendant de la séquence KDEL..... | 43 |
| → Mécanismes dépendants du motif di-Lysine (KKXX)..... | 43 |
| → Mécanismes dépendants du motif di-arginine (XXRR)..... | 45 |
| I.1.7.b. Mécanismes de rétention..... | 45 |
| → Rétention par oligomérisation des protéines..... | 46 |
| → Rétention dépendant de l'épaisseur des membranes..... | 46 |
| I.2. Résultats-discussion..... | 47 |
| I.2.1. Etude du signal de rétention de la protéine E2 du VHC..... | 49 |
| I.2.1.a. Etude de l'expression de protéines indicatrices contenant le domaine transmembranaire de E2..... | 49 |
| I.2.1.b. Etude de l'expression des protéines recombinantes E2 portant l'extrémité C-terminale de CD4..... | 50 |
| I.2.1.c. Influence des modifications de E2 sur la formation du complexe E1E2..... | 51 |
| I.2.1.d. Conclusions..... | 51 |
| I.2.2. Informations complémentaires concernant la rétention de E1 et E2..... | 52 |
| I.2.3. Etude du signal de rétention de la protéine E1 du VHC..... | 55 |
| I.2.3.a. Etude de la localisation intracellulaire des protéines CD4-E1 ₃₄₇ ou CD4-E1 ₃₅₃ | 55 |
| I.2.3.b. Etude du mode de compartimentalisation des protéines chimériques portant le domaine transmembranaire de E1..... | 55 |
| I.2.4. Conclusion..... | 56 |
| II. Etude des glycanes de E1 | 58 |
| II.1. Rappels de glycobioogie..... | 58 |
| II.1.1. Les différents types de glycosylation..... | 58 |
| II.1.2. La N-glycosylation..... | 59 |
| II.1.2.a. La glycosylation dans le RE..... | 60 |
| II.1.2.b. La glycosylation dans l'appareil de Golgi..... | 61 |
| II.1.2.c. Processus de "glucosylation-déglucosylation"..... | 61 |
| II.1.2.d. Contrôle de la glycosylation..... | 62 |
| → Influence de l'espèce..... | 62 |
| → Influence du contexte cellulaire..... | 64 |
| II.1.2.e. La glycosylation dans d'autres compartiments cellulaires..... | 64 |
| II.1.3. Défauts de glycosylation et pathologie..... | 65 |
| II.1.4. Facteurs influençant l'efficacité de glycosylation..... | 66 |
| → Distance entre le site de glycosylation et la membrane du RE..... | 66 |
| → Présence du site à proximité d'une extrémité N- ou C-terminale..... | 67 |
| → Influence du repliement sur la glycosylation des protéines..... | 67 |
| → Nature des acides aminés constituant la séquence cible: Asn-X-Ser/Thr-Y..... | 68 |
| → Influence des sites les uns sur les autres..... | 70 |
| II.1.5. Influence de la glycosylation sur différents phénomènes..... | 71 |
| II.1.5.a. Influence de la glycosylation sur le repliement..... | 71 |
| II.1.5.b. Influence de la glycosylation sur la voie de sécrétion..... | 72 |
| II.1.5.c. Implication de la glycosylation dans l'immunogénicité..... | 74 |
| → Influence d'un glycanne sur un site antigénique..... | 74 |
| → Le glycanne: un site antigénique à part entière ?..... | 76 |
| II.2. Résultats-discussion..... | 77 |
| II.2.1. Article n°3:..... | 80 |
| → Identification des sites de glycosylation fonctionnels..... | 80 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| → L'absence de glycosylation sur le site 5 est déterminée par la séquence en aa..... | 80 |
| → Analyse du rôle des glycannes de E1 dans la formation du complexe non-covalent E1E2..... | 81 |
| → Détermination de l'efficacité de glycosylation pour chacun des sites de E1..... | 82 |
| → Analyse de l'association des mutants de E1 avec la calnexine..... | 82 |
| → Conclusions..... | 83 |
| → Expériences complémentaires..... | 84 |
| II.2.2. Conclusions-Perspectives..... | 87 |

Généralités

I. Découverte du Virus de l'Hépatite C (VHC).

Dès les années 70, alors que les virus de l'hépatite B (Blumberg, et al. 1965) et de l'hépatite A (Feinstone, et al. 1973) étaient identifiés et les tests diagnostiques permettant la détection de ces deux virus établis (Bradley, et al. 1979, Prince 1968), il devint évident que 90% des hépatites post-transfusionnelles n'étaient pas dues à ces deux agents. De nombreuses équipes de recherche ont alors tenté de mettre en évidence l'agent de cette hépatite non-A, non-B.

Des expériences de transmission au chimpanzé, seul modèle animal connu, ont permis de démontrer l'existence d'un agent transmissible responsable de l'hépatite non-A, non-B (Alter, et al. 1978, Bradley, et al. 1985, Tabor, et al. 1978). Celui-ci se révéla sensible au chloroforme, suggérant l'existence d'une enveloppe (Bradley, et al. 1985). Les études d'ultrafiltration réalisées sur ce virus ont montré qu'il avait une taille comprise entre 30 et 80 nm (Bradley, et al. 1985, He, et al. 1987, Yuasa, et al. 1991).

Cependant, en raison de l'absence d'un système de culture cellulaire apte à multiplier efficacement le virus et du faible titre infectieux de celui-ci dans les sérums de chimpanzés, il fut impossible d'étudier plus avant cet agent.

Il faut attendre 1989 pour que ce virus soit caractérisé par le groupe de Houghton (Choo, et al. 1989) en collaboration avec l'équipe de Bradley du « Center for Disease Control » d'Atlanta. C'est par des techniques de biologie moléculaire (voir le principe figure 1) que, pour la première fois dans le domaine de la virologie, le génome viral a pu être identifié par clonage, avant tout isolement de la particule virale (les premières images de microscopie électronique commencent seulement à apparaître) (Kaito, et al. 1994).

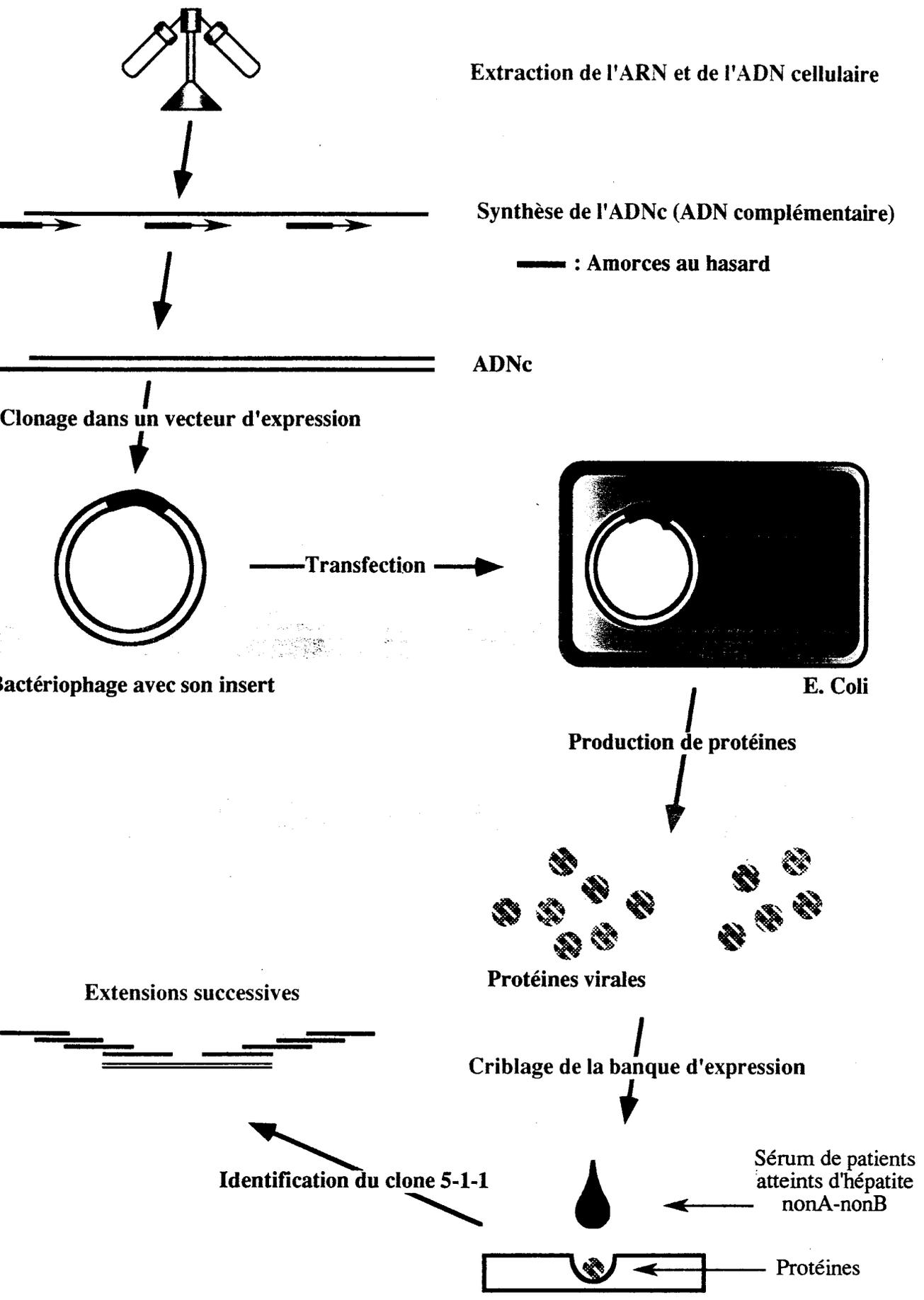
L'analyse comparative de ces séquences avec celles du virus de la fièvre jaune (YF) (Flavivirus) ou du virus de la peste porcine classique (CSFV) (Pestivirus) a permis de classer ce virus dans la famille des *flaviviridae* (Miller and Purcell 1990)

II. Epidémiologie

Figure 1 : Principe de l'isolement du virus de l'hépatite C

Par le groupe de Houghton des laboratoires Chiron et l'équipe du Dr. Bradley du "Center for Disease Control" d'Atlanta.

Le matériel de départ dérivait d'un lot de facteur VIII antihémophiliques connus comme infectieux et enrichis par passages successifs chez le chimpanzé (Bradley et al., 1979). Les acides nucléiques ont été extraits du plasma de ces chimpanzés. L'action de la transcriptase inverse a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir de fragments simple brin d'ADN et d'ARN. Ces ADNc ont ensuite été insérés dans des vecteurs λ gt₁₁ qui ont servi à transfecter des bactéries. Des protéines virales synthétisées à partir de séquences nucléotidiques transfectées ont été identifiées par immunomarquage avec des anticorps sériques de patients atteints d'hépatite non A non B. L'isolement de clones codant pour des pelyptides viraux a alors permis le séquençage complet du génome du virus responsable de la plupart des hépatite nonA nonB, désormais appelé virus de l'hépatite C (Trépo, 1990).



L'hépatite C, maladie répandue dans le monde entier, représente un problème majeur de santé publique. De nombreuses études réalisées sur des donneurs de sang ont permis d'étudier la prévalence des anticorps anti-VHC dans différentes régions du globe (figure 2). Elle ont permis de montrer que cette infection touche environ 1% de la population mondiale. La séroprévalence, relativement faible dans le nord de l'Europe et aux Etats Unis (entre 1 et 1,5%), est plus forte dans le sud de l'Europe, en Asie du sud-est (jusqu'à 3%), en Afrique du nord et au Moyen Orient (1,4 à 2,1%). Des séroprévalences très préoccupantes sont trouvées en Ukraine, dans les pays de l'Afrique centrale et en Egypte où la prévalence est estimée à 14,5%.

En France, on estime que 500 000 à 1 000 000 de personnes sont contaminées.

La transmission se fait essentiellement par voie parentérale mais d'autres voies de transmission ont été rapportées. Néanmoins, environ 40% des contaminations n'ont pas de causes identifiées (hépatites sporadiques). Il est vraisemblable qu'une partie de ces contamination non-identifiées aient pu avoir lieu par voie nosocomiale.

II.1. Transmission par voie parentérale

- Avant la mise au point des tests permettant le dépistage du VHC, on estime que 10 à 20% des individus ayant reçu des produits sanguins, étaient infectés par ce virus. Le développement de ces tests et le traitement systématique des lots sanguins de façon chimique ou thermique, ont pratiquement fait disparaître les risques liés à la transfusion sanguine. Ainsi, alors qu'avant 1990, le risque de contamination était de 450 sur 100 000 unités transfusées, il n'est plus aujourd'hui que de 1 sur 100 000 unités transfusées (Schreiber, et al. 1996).

Néanmoins, les statistiques réalisées concernant les hémophiles restent préoccupantes. On estime en effet actuellement qu'environ 76% d'entre eux sont porteurs du virus (Mauserbunschoten, et al. 1995, Morfini, et al. 1994, Soni, et al. 1993, Troisi, et al. 1993, Wagner and Rotthauwe 1994). Les statistiques atteignent même 84 à 100% lorsque les procédures d'inactivation du virus dans les lots sanguins ne sont pas respectées, comme le montrent les études réalisées sur des groupes d'hémophiles américains (Troisi, et al. 1993, Wagner and Rotthauwe 1994).

- Les patients déficients en immunoglobulines et recevant des préparations d'anticorps ont également été décrits comme faisant partie d'un "groupe à risques" (Flora, et al. 1996,

Healey, et al. 1996). En effet, des études montrent que l'on détecte la présence de l'ARN viral dans une préparation d'anticorps sur deux (Yu, et al. 1994).

- Le virus peut être également contracté lors d'une dialyse (Bukh, et al. 1993, Cassidy, et al. 1995, Dussol, et al. 1993, Lin, et al. 1993). La prévalence varie ici entre 8 (Bukh, et al. 1993) et 69% (Taiwan) (Lin, et al. 1993). Il semblerait que le risque de transmission soit corrélé avec la durée et la fréquence des dialyses (Cassidy, et al. 1995, Okuda, et al. 1995).

- Chez les transplantés rénaux, la prévalence de l'hépatite C est importante en raison de la forte diffusion virale chez les dialysés et des protocoles de préparation à la greffe qui prévoient une transfusion sanguine. (Bang, et al. 1995, Genesca, et al. 1995). Elle est d'environ 25% en France.

- Pour les toxicomanes par voie intraveineuse, les prévalences apparaissent extrêmement élevées en raison de l'utilisation de seringues souillées. En fonction des populations concernées, le taux de contamination varie entre 50 et 100% des individus (Fingerhood, et al. 1993, Maayan, et al. 1994, Mauserbunschoten, et al. 1995, Van Ameijden, et al. 1993, Woodfield, et al. 1993). En Europe, ces statistiques oscillent entre 70 et 92% (Esteban 1993).

Il faut noter que la contamination par piqûre accidentelle avec des aiguilles souillées semble dépendre de la quantité de sang transférée, du titre du virus ainsi que de la profondeur de l'injection. Un individu étant ainsi en contact avec le virus a environ 2% de chance d'être contaminé (Kiyosawa, et al. 1990, Puro, et al. 1995).

- Enfin, il convient de rappeler que le piercing, le tatouage, l'acupuncture, la mésothérapie et certaines pratiques traditionnelles impliquant un contact avec le sang sont régulièrement mis en cause dans la transmission du virus (Kiyosawa, et al. 1994, Mele, et al. 1995).

II.2. Transmission par voie sexuelle

Il a été montré que la transmission par voie sexuelle du virus de l'hépatite C était possible mais beaucoup moins fréquente que pour l'hépatite B. Des études réalisées en Europe et aux Etats Unis indiquent que le risque de transmission entre partenaires hétérosexuels est relativement faible (Gordon, et al. 1992, Meisel, et al. 1995, Soto, et al. 1994). Des risques de transmission plus importants sont détectés dans certains pays d'Asie (Chang, et al. 1994, Nakashima, et al. 1995). Pourtant, le mécanisme de la transmission par cette voie devra être

plus clairement défini. En effet, plusieurs études montrent qu'on ne détecte pas le virus dans le sperme, la salive et les sécrétions vaginales (Chang, et al. 1994, Nakashima, et al. 1995).

Aussi, ce mode de contamination, s'il semble avoir une existence réelle, ne paraît pas être une cause majeure de la propagation du virus.

II.3. Transmission materno-foetale

Aujourd'hui encore le mécanisme de cette transmission reste discuté (Nousbaum, et al. 1995). Mais, bien que l'infection intra-utérine ait été postulée, la contamination materno-foetale surviendrait plutôt lors du travail ou au moment de la libération (Weiner, et al. 1993). Ainsi, l'ARN du VHC a été détecté dans le fluide puerpéral et dans les menstrues (Kurauchi, et al. 1993, Silverman, et al. 1994). Cet ARN est également détecté de façon transitoire dans le sang du cordon chez 40% des nouveaux-nés de mères infectées (Kurauchi, et al. 1993, Silverman, et al. 1995). Ainsi, le risque de transmission périnatale varie entre 0 et 7% (Kurauchi, et al. 1993, Moriya, et al. 1995, Silverman, et al. 1995).

Par contre, il n'est pas encore clairement établi si l'allaitement par une mère infectée représente un risque pour l'enfant.

II.4. Transmission familiale

Un certain nombre de publications rapportent la possibilité d'une contamination horizontale (sexuelle et sanguine exclues) suggérant l'existence d'une transmission intrafamiliale (Kiyosawa, et al. 1994). Mais, s'il existe, le mécanisme de transmission par cette voie reste inconnu. De plus, aucune étude n'a pu exclure la possibilité qu'une contamination puisse se produire par le biais de micro-effractions vasculaires ou épithéliales.

Enfin, on ne peut oublier de citer dans la liste des groupes à risque les individus souffrant d'alcoolisme. En effet, un certain nombre de travaux rapportent que la prévalence chez les alcooliques est plus élevée que pour la population générale. Un taux moyen de contamination de 16% est avancé, avec des prévalences beaucoup plus importantes dans certains pays comme l'Italie (48%) (Bode, et al. 1995, Fong, et al. 1994, Mendenhall, et al. 1993, Verbaan, et al. 1993, Zignego, et al. 1994). De plus, il semblerait que l'infection par le

VHC et la prise d'alcool aient des effets cumulatifs, en favorisant un taux plus élevé de virus circulants et entraînant des lésions hépatiques plus sévères (Coelho, et al. 1995, Fong, et al. 1994, Gonzalez, et al. 1995, Zignego, et al. 1994).

III. Diagnostic de l'hépatite C

Il est important de réaliser le diagnostic de l'hépatite C le plus précocement possible afin de gérer au mieux l'évolution de la maladie.

En ce qui concerne les tests sérologiques permettant la mise en évidence d'anticorps anti VHC, on les classe en deux types: les tests de dépistage et les tests de validation. Le manque de spécificité des tests de première génération basés sur la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a conduit à développer des tests RIBA (recombinant immunoblot assay).

Des tests permettant la détection des IgMs anti-VHC ont également été récemment développés (HCV IgM EIA, Abbot Diagnostics), mais leur intérêt reste cependant discuté (Pawlotsky 1996).

Il existe depuis 1990 (Garson, et al. 1990, Weiner, et al. 1990) des tests de diagnostic moléculaire permettant la détection de l'ARN viral, basés sur la technique de PCR. Il sont principalement utilisés quand les résultats des tests sérologiques présentent des ambiguïtés.

Enfin, très récemment, des tests quantitatifs détectant l'ARN viral ont été commercialisés. Ils sont basés sur l'utilisation de la technique de l'ADN branché.

III.1. Diagnostic sérologique

Ce sont des tests de type immuno-enzymatiques, ou ELISA. Ils permettent la détection d'anticorps anti-VHC dans le sérum des patients. Ces tests, élaborés en 1989 et mis sur le marché dès 1990 (Kuo, et al. 1989), utilisaient comme antigène la protéine recombinante c100-3 qui couvre la zone de jonction entre les protéines NS3 et NS4 (voir figure 3). Pourtant, il apparaît rapidement que ces tests ne permettent de détecter que 80% des individus infectés.

Ces inconvénients ont amené à développer des tests de validation. Ils sont basés sur une technique d'immunoblotting, ou RIBA. Ces tests associent à la protéine c100-3, des peptides synthétiques et des antigènes recombinants comme la protéine c22 qui représente la nucléocapside, la protéine c33c qui couvre la majeure partie de NS3 et la protéine c200 qui correspond aux protéines NS3 et NS4 (voir figure 3) (Katayama, et al. 1992).

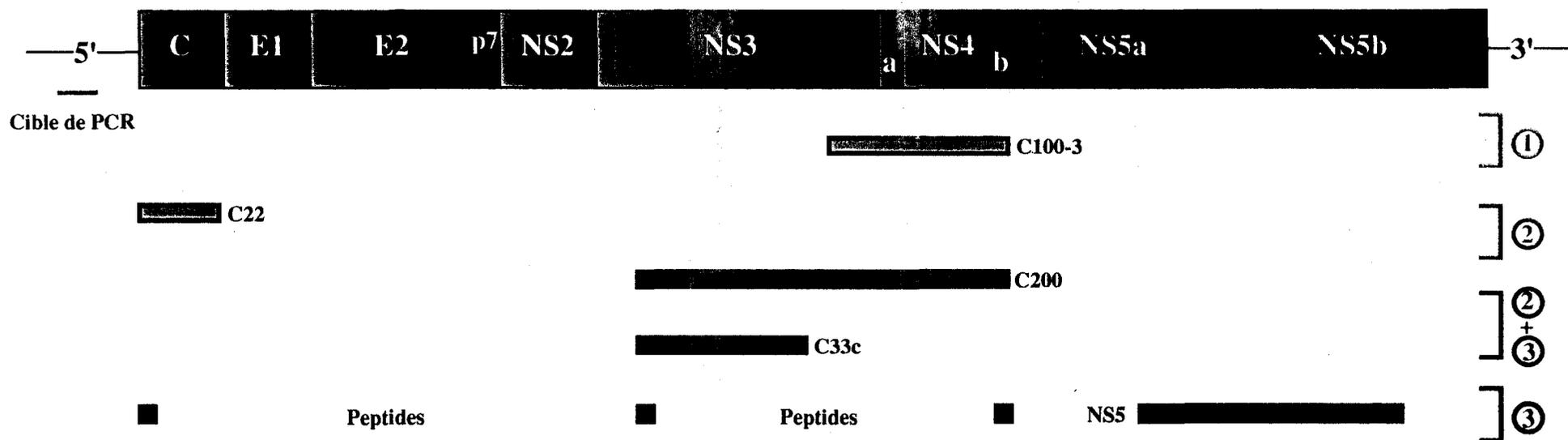


Figure 3 : Antigènes dérivés du génome du VHC et utilisés dans les tests de dépistage sérologique

Les antigènes présentés sont ceux utilisés principalement dans les tests de première génération (1), de deuxième génération (2) et de troisième génération (3).

(d'après Van Der Poel et al. 1994)

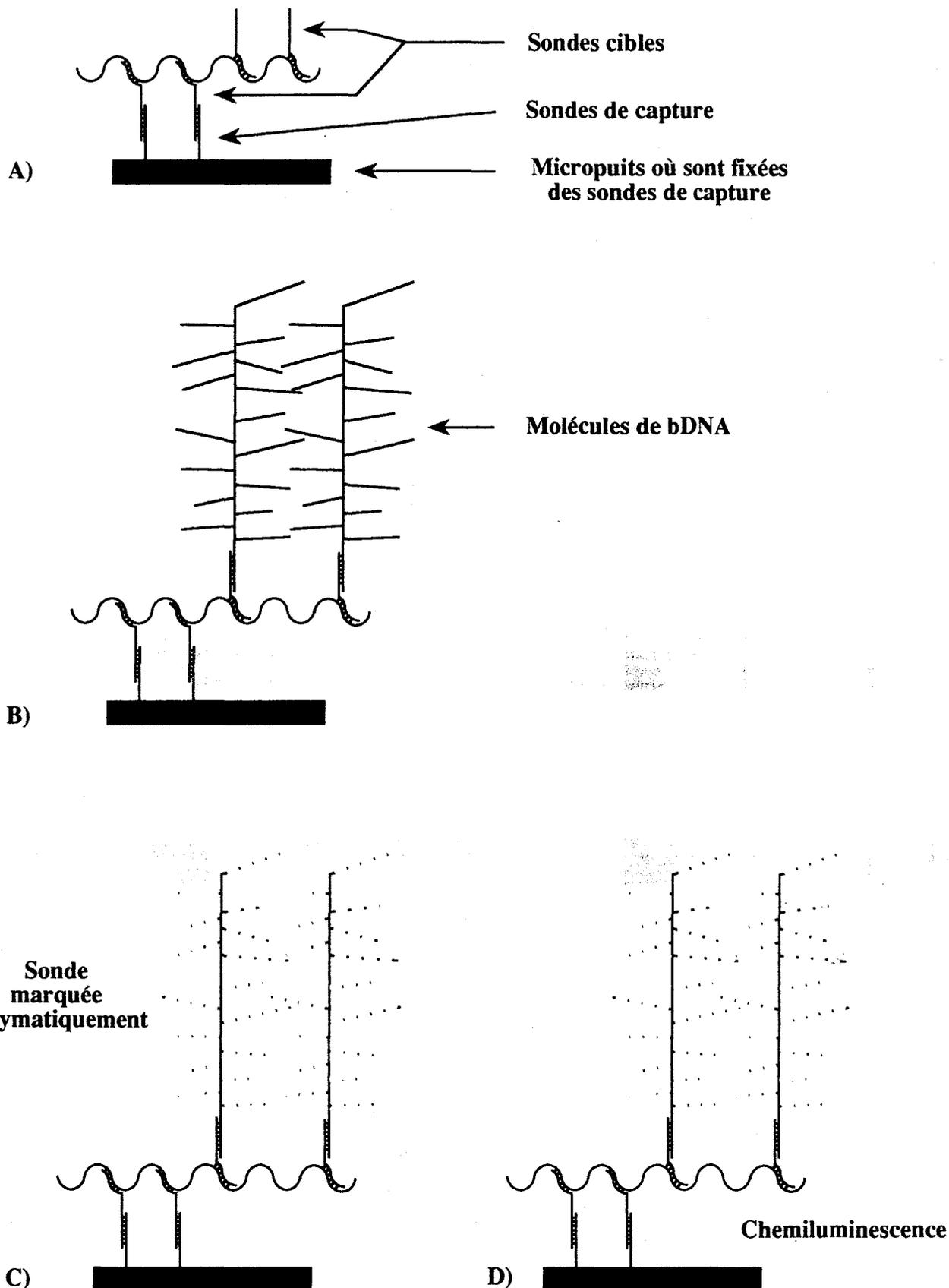


Figure 4 : Méthode de détection quantitative de l'ARN viral: technique de l'ADN branché.
 QuantiplexR HCV RNA 1.0 et 2.0, Chiron Diagnostics

Les tests de troisième génération combinent également des peptides correspondant à des régions à la fois plus conservées et plus réactives du génome viral, comme la partie N-terminale de la protéine C, ou comme certaines régions de E2 ou NS5 (voir figure 3) (Nakagiri and Ichihara 1995).

Ainsi, grâce à leur développement, le risque de contamination transfusionnelle qui était de 6 à 10% dans les années 1980, est passé à 0,02% par unité de sang transfusé aujourd'hui (Cahour 1995).

Pourtant, ces tests sérologiques de dernière génération ont aussi leurs limites. Ainsi, il reste toujours des cas où le diagnostic est difficile voire impossible. Ceci concerne les personnes immunodéprimées présentant un taux d'anticorps particulièrement faible, et les malades se trouvant dans la « période silencieuse », c'est à dire entre l'infection et la séroconversion (ou apparition des premiers anticorps).

Enfin, ces tests ne rendent pas compte de la charge virale mais rapportent seulement un contact du patient avec le virus.

Aussi, il est parfois indispensable de disposer de tests dirigés contre le génome du virus, permettant un diagnostic moléculaire.

III.2. Diagnostic moléculaire

- La détection de l'ARN viral passe par une première étape de rétrotranscription générant un brin d'ADN complémentaire (cADN) sur modèle d'ARN. C'est ce cADN qui sera ensuite amplifié par PCR (Polymérase Chain Réaction) à l'aide d'amorces choisies en général dans la région 5'NC connue pour être particulièrement bien conservée (Bukh, et al. 1992, Bukh, et al. 1992). Cette technique est très sensible et peut détecter de très faibles quantités d'ARN viral. Elle permet ainsi de mettre en évidence la présence du virus une semaine après la contamination d'un patient par transfusion (Farci, et al. 1992), précédant alors la séroconversion de 12 semaines.

Néanmoins, cette méthode nécessite d'être standardisée, notamment en ce qui concerne les étapes préparatoires des échantillons à tester. En effet, des contaminations accidentelles peuvent être à l'origine de faux positifs.

- Récemment une méthode de détection quantitative de l'ARN viral a été commercialisée par la société Chiron (Quantiplex^R HCV RNA 1.0 et 2.0, Chiron Diagnostics). Elle utilise la technique de l'ADN branché ou bDNA (Urdea, et al. 1991). Elle consiste en une capture en

sandwich de la molécule d'ARN cible par des sondes spécifiques bivalentes, qui vont elles mêmes être hybridées par une sonde appelée ADN branché. Celle-ci sert de support à de nombreuses sondes marquées à la phosphatase alcaline, qui en présence d'un substrat, vont entraîner l'émission d'un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ARN cible. Cette technique est moins sensible que la PCR mais permet de donner un résultat quantitatif et permet une appréciation indirecte de l'importance de la réplication virale (voir figure 4).

IV. Physiopathologie de l'hépatite C

Les conséquences d'une infection par le virus de l'hépatite C peuvent être dramatiques. Cette contamination peut en effet mener au développement d'une cirrhose qui peut être fatale mais aussi dégénérer en carcinome hépatocellulaire qui reste mortel dans la majorité des cas. La sévérité de ces affections est liée à l'évolution vers la chronicité de la majorité des infections par le VHC. L'apparition de lésions hépatiques est continue et l'activité virale persiste même lors des phases critiques de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire (Bouffard, et al. 1992).

On distingue plusieurs phases successives dans l'évolution de la maladie.

- 1) L'infection, détectable chez un patient une semaine après la contamination.
- 2) L'hépatite aiguë, généralement caractérisée par une élévation des amino transférases.
- 3) L'infection chronique, qui s'installe alors dans 50 à 75% des cas. Elle peut avoir une durée d'évolution très variable.

20% des hépatites chroniques vont mener au développement d'une cirrhose qui peut dégénérer en carcinome hépato-cellulaire.

IV.1. L'hépatite aiguë

Elle se produit de 2 semaines à 6 mois après l'infection. Durant ce temps de latence caractéristique du VHC, le virus est présent dans l'organisme (Shimizu, et al. 1990). On peut également observer une augmentation (d'importance variable selon le sujet) du taux sérologique des ALTs (ALT pour ALanine amino Transférase), caractéristique de la destruction des hépatocytes. Cette phase de la maladie reste asymptomatique dans deux tiers des cas. Lorsqu'elle est symptomatique, elle se manifeste par un certain nombre de signes cliniques, tel que l'ictère dans environ un quart des cas. Elle peut également s'illustrer par des céphalées, une fièvre modérée et une asthénie intense, plus rarement une hépatomégalie ou une splénomégalie.

Des cas d'hépatites fulminantes ont été décrits (Yoshida, et al. 1994), mais ils demeurent extrêmement marginaux.

A ce stade, le système immunitaire parvient dans un tiers des cas à éliminer le virus. La plupart du temps, l'hépatite aiguë conduit à l'hépatite chronique.

IV.2. L'hépatite chronique

Durant cette phase, on peut observer que le taux sérologique des ALTs varie en présentant plusieurs pics successifs. Le premier de ces pics peut être très précoce après la primo infection. Bien que chez un certain nombre de sujets le taux d'ALT puisse se normaliser, la virémie persiste (DiBisceglie, et al. 1991). Le siège de l'activité virale se localise principalement au niveau des cellules hépatiques. Les conséquences de la chronicité vont dépendre de la dynamique de la maladie. On distingue en effet l'hépatite chronique persistante de l'hépatite chronique active.

- Dans le premier cas, les lésions histologiques vont être limitées. L'inflammation reste localisée à la région périportale.

- Dans le second cas, les lésions sont beaucoup plus étendues. En plus de l'inflammation périportale, on observe l'apparition de nodules lymphoïdes dans cette région, d'altération des canaux biliaires interlobulaires, d'une infiltration du foie par des lymphocytes et d'une fibrose. Une biopsie hépatique permet de préciser alors le stade de la maladie.

Cette nécrose inflammatoire va entraîner l'apparition d'une cirrhose pour 20% des malades chroniques.

IV.3. La cirrhose

La nécrose inflammatoire va s'étendre et peut mener dans 20 à 25% des cas à un arrêt total des fonctions du foie. Cette dysfonction va donc nécessiter une transplantation. Pourtant, on assiste très souvent à une réinfection du greffon, alors même que l'ARN du virus n'est plus détectable dans le sérum au moment de la greffe. Les PBMCs, qui ont été décrits à plusieurs reprises comme étant infectés *in vivo* par le VHC (Bouffard, et al. 1992, Muller, et al. 1993), peuvent probablement constituer des sites extra-hépatiques (désignés comme les « réservoirs à virus ») responsables de cette réinfection rapide (Lerat and Inchauspé 1997).

L'intervalle moyen entre l'infection et le déclenchement de la cirrhose est estimé à 10 à 15 ans. Le potentiel évolutif d'une cirrhose est le carcinome hépato-cellulaire. Le risque de survenue de ce cancer serait de l'ordre de 5% à 15 ans (Kiyosawa, et al. 1990).

IV.4. Le carcinome hépato-cellulaire

Il a été montré que l'ARN viral pouvait être mis en évidence au sein des tumeurs (Chou, et al. 1991). L'effet carcinogène du virus est actuellement à l'étude dans de nombreux laboratoires. Pourtant, l'intervalle de temps important entre l'infection et l'apparition du carcinome hépatocellulaire, ainsi que la nécessité apparente d'une cirrhose préexistante, semblent indiquer que le virus n'est pas oncogène par lui-même. De même, aucune activité de transcription inverse n'a été observée dans le cas du VHC. En conséquence, il ne peut y avoir de synthèse d'ADN susceptible de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte et entraîner une mutagenèse insertionnelle.

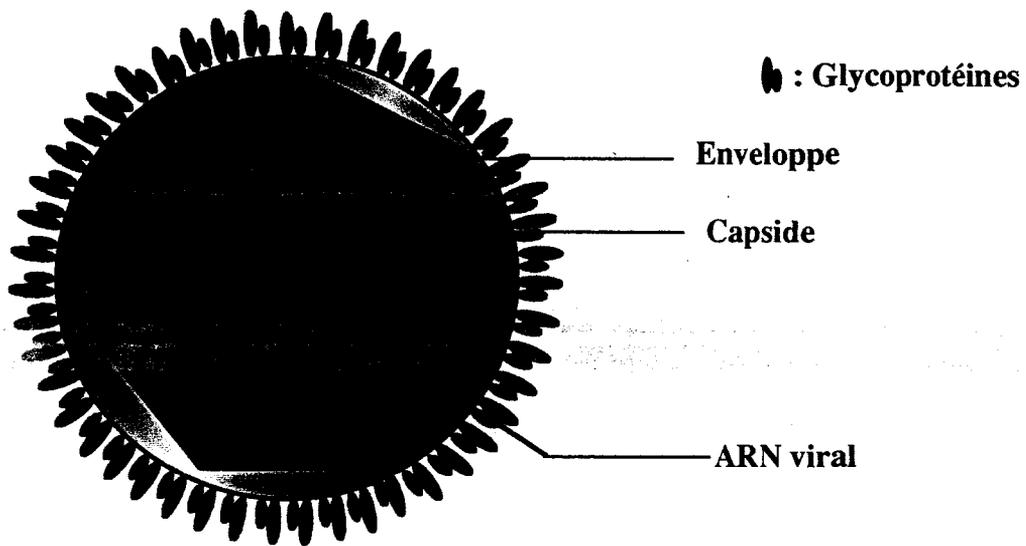
Un certain nombre de facteurs ont été décrits comme pouvant favoriser une évolution critique de la maladie. Le génotype du virus semble être un facteur important (DiBisceglie 1997, Donato, et al. 1997, Dusheiko, et al. 1994, Pozzato, et al. 1994). La contamination par transfusion est liée à un pronostic plus défavorable que pour les autres voies (Gordon, et al. 1993). La coinfection avec le virus de l'hépatite B (DiBisceglie 1997, Fong, et al. 1991) ainsi que la consommation même modérée d'alcool (DiBisceglie 1997, Mendenhall, et al. 1991) sont également décrits comme des facteurs aggravants.

En dehors de ce schéma classique d'évolution de la maladie, la présence du VHC dans l'organisme est également associée à un certain nombre de pathologies auto-immunes.

IV.5. Pathologies auto-immunes associées au VHC

50% des cas d'hépatite chronique sont associés à une cryoglobulinémie mixte de type II (Ferri, et al. 1993, Lunel, et al. 1994). Cette pathologie se caractérise par l'apparition de complexes immuns circulants qui ont la propriété de précipiter à une température inférieure à 37°C. Cette pathologie peut entraîner des complications cutanées, rénales, articulaires ou neurologiques. La cryoglobulinémie semble être associée de façon spécifique et régulière à ce virus.

Figure 5 : Représentation théorique du virus de l'hépatite C



L'infection par le VHC peut également être associée à l'apparition d'un syndrome de Sjögren, caractérisé par une infiltration des glandes salivaires par des lymphocytes.

On peut également rencontrer des cas associés de porphyrie cutanée (Decastro, et al. 1993), de maladies auto-immunes du foie (Koskinas, et al. 1994) et de lichen plan.

Enfin, on détecte souvent la présence d'auto-anticorps dans le sérum: Ac anti noyau, anti muscle lisse, anti KLM (ou Liver Kidney Microsomial) (Lunel, et al. 1992).

V. Traitement de L'hépatite C

Le seul traitement actuellement prescrit en France est basé sur l'utilisation de l'IFN α (Lindsay 1997). La molécule traditionnellement utilisée est une protéine recombinante (CIFN), Intron^R et Roferon A^R, dont la séquence est un consensus de celle des 4 sous-types d'IFN α . Le mécanisme d'action de ces molécules est complexe et non complètement élucidé. En se liant à des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire, l'IFN active une voie de seconds messagers qui conduit à l'expression de nombreux gènes comme les protéines Mx, les 2'-5' oligoadénylate synthétases, la protéine kinase dépendante d'ARN bicaténaire (PKR) et l'oxyde nitrique synthase (pour revue, voir (Meurs 1997)). Ces protéines ont de nombreuses activités antivirales, supresseur de tumeur, etc....

Le traitement habituel prévoit l'administration de 6 à 10 millions d'unités, trois fois par semaine pendant douze mois. Ce traitement est malheureusement peu efficace. En effet, on observe une normalisation des transaminases chez seulement 50% des patients. De plus, à l'arrêt du traitement, la moitié des répondeurs rechutent. Finalement, une normalisation à long terme (après six mois suivant l'arrêt du traitement) n'intervient que pour 20 à 25% des sujets (Nousbaum, et al. 1995).

Une autre molécule, la Ribavirine, est actuellement évaluée pour le traitement de l'hépatite C. C'est un analogue de la guanosine, modifié au niveau de la base. Pour exercer son action antivirale, cet analogue de la guanosine doit subir une phosphorylation intracellulaire. Elle inhibe indirectement la synthèse d'acides nucléiques viraux par effet de compétition avec le stock de guanosine de la cellule infectée. Elle aurait également un effet inhibiteur direct sur l'ARN polymérase ARN dépendante. Néanmoins, son impact sur la multiplication virale et sur l'histologie semble faible et son utilisation serait potentiellement plus intéressante en association avec l'IFN.

Aussi, on distingue trois groupes de patients en fonction de leur réponse au traitement:

- Les Répondeurs (R) chez qui on observe une normalisation du taux d'ALT sérique au moment du traitement et au delà de six mois suivant l'arrêt du traitement. Cette réponse s'accompagne d'une disparition de l'ARN viral sérique et d'une diminution de l'activité histologique (Miyajima, et al. 1998). Néanmoins, il n'est pas démontré que ce traitement prévienne chez les répondeurs les complications à long terme comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire.

- Les Répondeurs Rechuteurs (RR) qui répondent favorablement au traitement par une normalisation des ALT mais qui, dès la fin de celui-ci ou dans les six mois qui suivent, voient leur taux de transaminase remonter. Cette augmentation des ALT est généralement corrélée avec une réapparition de l'ARN viral sérique. Chez les RR, le traitement semble tout de même apporter une amélioration histologique. Un deuxième traitement serait positif pour 50% des rechuteurs (Chemello, et al. 1997).

- Les non-répondeurs (NR) pour qui l'absence de réponse s'illustre par une absence de normalisation des ALT. Il ne semble pas y avoir d'amélioration histologique et un deuxième traitement n'est pas recommandé.

Le traitement par l'IFN peut donner lieu à des effets secondaires: syndrome grippal, anxiété et état dépressif (Hunt, et al. 1997) et activation ou amplification de désordres auto-immuns (arthrite (Chung and Older 1997),...). Il est également extrêmement contre-indiqué dans un certain nombre de cas: grossesse, insuffisance rénale sévère, hépatite auto-immune, cardiopathie sévère, transplantation rénale,...

Enfin, on peut résumer les facteurs prédictifs de bonne réponse de la façon suivante: sexe féminin, jeune âge, absence de consommation d'alcool même modérée, absence de surcharge en fer et d'obésité, un génotype viral différent du génotype 1 et une charge virale faible (Shiratori, et al. 1997, Takagi, et al. 1997).

VI. Le Virus de l'Hépatite C

D'après les données obtenues par microscopie électronique, le VHC se présenterait donc sous la forme d'une petite particule sphérique portant à sa surface de fins spicules (probablement les protéines E1 et E2), et dotée d'un core de 30 à 35 nm de diamètre [Kaito, 1994 #11]. La taille de la particule virale doit être définie plus précisément. Elle serait de 45 nm selon l'équipe de Mizuno (Mizuno, et al. 1995), de 55 nm selon l'équipe de Takahashi (Takahashi, et al. 1992) ou de 60 nm selon l'équipe de Kaito (Kaito, et al. 1994). Tous ces

Figure 6 : Organisation du génome du VHC

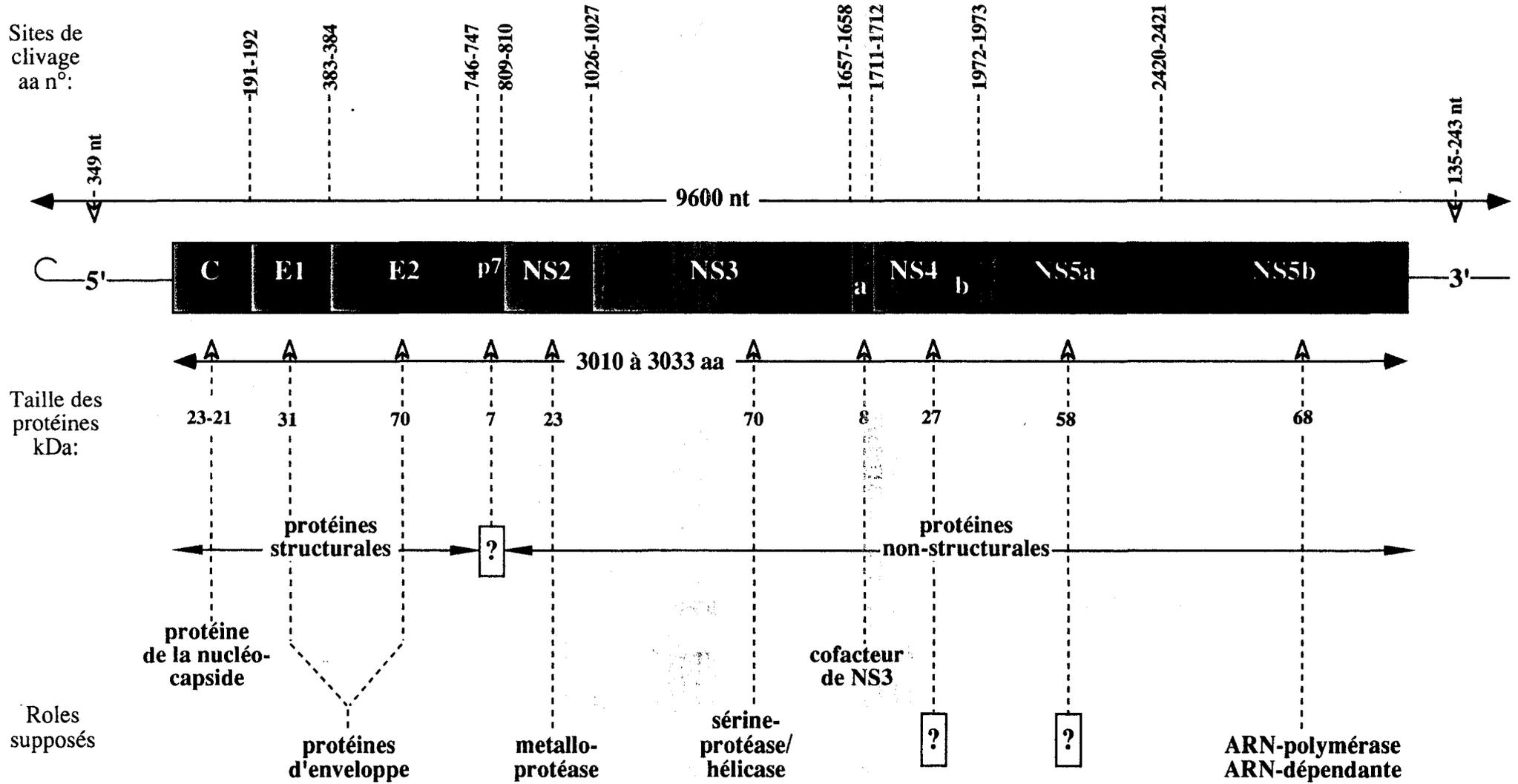


Figure 7 : Le processing de la polyprotéine du VHC

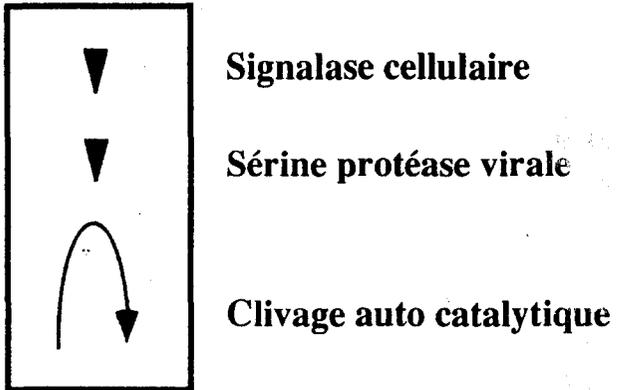
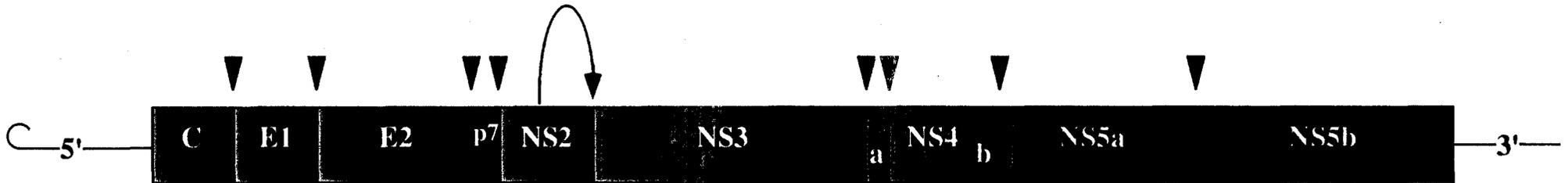


Figure 8 : La Famille des Flaviviridae

HEPACIVIRUS

protease/helicase

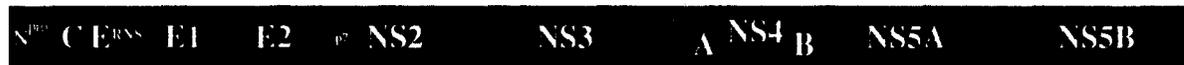
polymerase



PESTIVIRUS

protease/helicase

polymerase



FLAVIVIRUS

protease/helicase

polymerase



■ PROTEINES STRUCTURALES

■ PROTEINES NON STRUCTURALES

Génotype III/2a

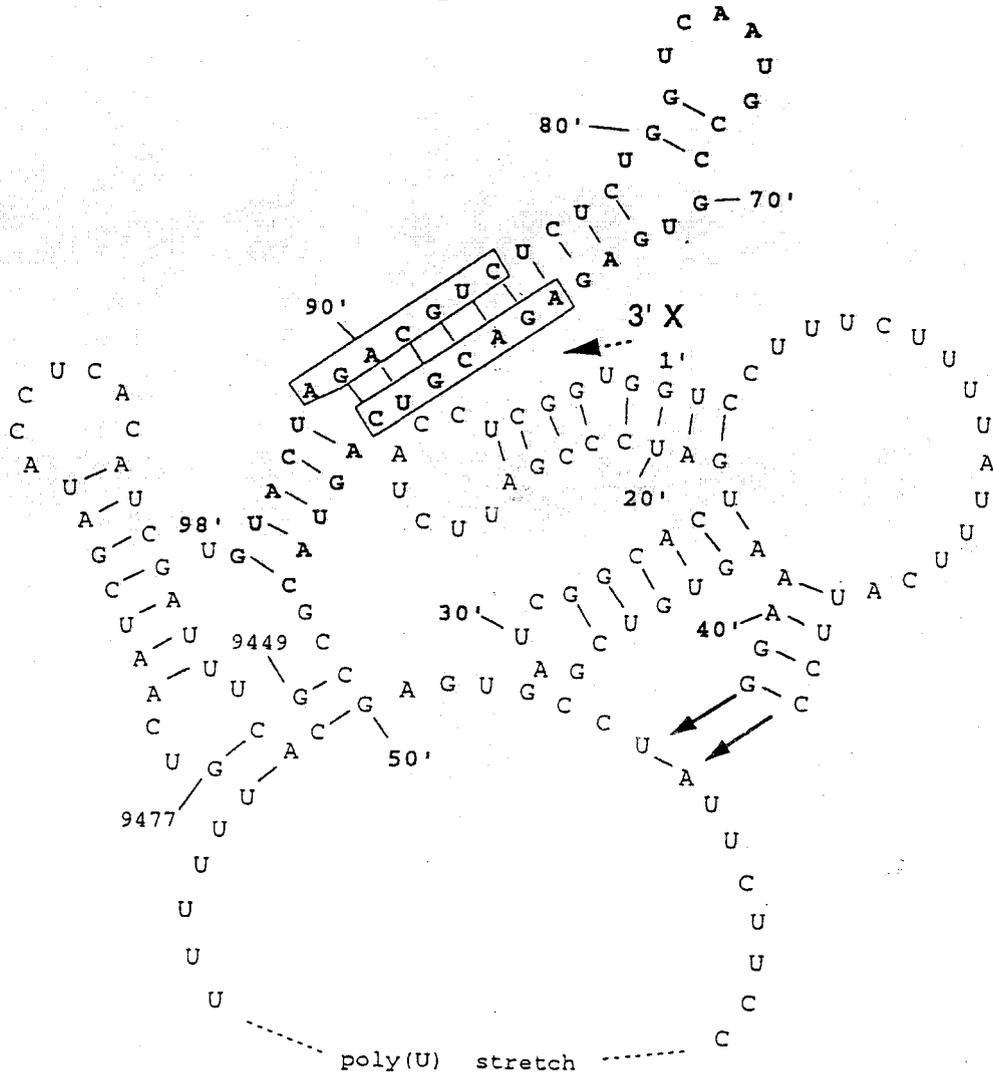


Figure 10 : Modèle de structure secondaire de l'extrémité 3' non-codante du génome du VHC (génotype III/2a)

D'après Tanaka et al, (1996)

travaux sont en accord avec l'étude de He (He, et al. 1987) qui dès 1987, par des expériences d'ultra-filtration, estimait cette taille comprise entre 30 et 60 nm (voir figure 5).

VII. Le génome du VHC

Le génome du VHC est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive d'environ 9600 nucléotides (Choo, et al. 1991, Houghton, et al. 1991, Kolykhalov, et al. 1997). Deux régions non-codantes, localisées aux extrémités 5' et 3', encadrent un large cadre ouvert de lecture qui code une polyprotéine (souche H, voir figure 6) dont la taille varie selon les génotypes: 3010 à 3014 aa pour les virus de génotype 1, 3033 aa pour les virus de génotype 2, 3021 aa pour les virus de génotype 3 (Bukh, et al. 1995).

Cette polyprotéine libère après clivage par des protéases d'origine cellulaire et virale, les différentes protéines structurales et non-structurales du VHC (voir figure 7). Cette organisation est comparable à celle observée chez les flavivirus et les pestivirus (voir figure 8).

VII.1. Les extrémités non-codantes

VII.1.1. L'extrémité 5' non-codante (5'NC)

La région 5'NC du génome du VHC est la zone la plus conservée du génome entre les différents isolats viraux décrits dans la littérature (Bukh, et al. 1992, Chen, et al. 1991). Cette région montre une forte homologie de séquence avec celle des pestivirus (Han, et al. 1991). Sa taille a longtemps été estimée à 341 nucléotides, mais très récemment, la mise en évidence d'une séquence CCCCCCA à son extrémité 5', semble porter celle-ci à 349 nucléotides (Trowbridge and Gowans 1998). Plusieurs codons (AUG) d'initiation de la traduction sont présents sur l'extrémité 5'NC. Mais, s'ils définissent des petits cadres ouverts de lecture, leurs produits n'ont jamais été identifiés (Tsukiyamakohara, et al. 1992).

Comme pour certains virus à ARN, cette région est impliquée dans le processus d'initiation de la traduction. De nombreuses études montrent l'existence d'une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) portée par le génome du VHC, permettant la fixation interne du ribosome et l'initiation de la traduction (Han, et al. 1991, Tsukiyamakohara, et al. 1992, Wang, et al. 1993, Yoo, et al. 1992). On admet habituellement que la structure IRES constitue un mécanisme alternatif d'initiation de la traduction d'un ARN non coiffé. Le modèle proposé par

Lemon et Honda (Lemon and Honda 1997), qui est un modèle adapté de celui de Brown et al. (Brown, et al. 1992) suggère une structure secondaire relativement complexe de l'extrémité 5'NC (voir figure 9). Elle est constituée de quatre domaines majeurs (I à IV), le troisième étant analogue au domaine III du modèle établi pour les pestivirus (Brown, et al. 1992). Plusieurs équipes se sont attachées à mettre en évidence la séquence minimale nécessaire à l'initiation de la traduction. Brown et al. montrent qu'une délétion au delà du nucléotide 72 abolit l'initiation de la traduction, alors que l'équipe de Tsukiyamakohara place ce nucléotide critique en position 98 (Tsukiyamakohara, et al. 1992). D'autre part, l'équipe de Katayama montre que la structure en « alpha branch » présente sur le domaine II entre les nucléotides 47 et 67 serait un élément indispensable (Fukushi, et al. 1994) ce qui semble indiquer que le domaine II est un élément crucial pour l'initiation de la traduction. Cette hypothèse est renforcée par le travail de Rijnbrand et al. qui montre que seule la boucle I n'est pas indispensable à l'initiation (Rijnbrand, et al. 1995).

L'initiation de la traduction serait de plus favorisée par la fixation de facteurs cellulaires. Fukushi et al. ont identifié une protéine de 25 kDa interagissant avec l'IRES (Fukushi, et al. 1997). D'autre part, deux protéines cellulaires (p87 et p120) ont été mises en évidence par l'équipe de Yen (Yen, et al. 1995). Leur site de fixation se situerait au niveau de l'épingle à cheveux III. Ces protéines favoriseraient l'initiation de la traduction pour l'une (p120) et la réplication virale pour l'autre (p87). Récemment, l'équipe de Sizova (Sizova, et al. 1998) a montré que la protéine eIF3 (eukaryotic Initiation Factor 3) se fixerait au niveau de la boucle b du domaine III et jouerait un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction en favorisant la fixation de l'ARN à la sous-unité 40S du ribosome.

VII.1.2. *L'extrémité 3' non-codante (3'NC)*

On distingue trois parties dans la région 3' non-codante: une séquence de 27 à 45 nucléotides peu conservée entre les différents isolats, une séquence polyuridylée de 10 à 130 nucléotides, et enfin une séquence extrêmement conservée de 98 nucléotides décrite depuis peu (Kolykhalov, et al. 1996, Tanaka, et al. 1996). Depuis le modèle proposé par Tanaka et al. (Tanaka, et al. 1996) (voir figure 10), plusieurs études sont venues préciser la structure adoptée par cette extrémité. Ito et al. (Ito and Lai 1997), par des expériences de digestion à la RNase, décrivent la présence de trois épingles à cheveux, la deuxième et la troisième étant les plus conservées. Par ailleurs, Blight et al. (Blight and Rice 1997) indiquent la présence d'une épingle

à cheveux à l'extrémité 3' et une séquence beaucoup moins ordonnée à l'extrémité 5' de cette même extrémité.

Comme cela est décrit pour d'autres systèmes viraux, l'extrémité 3'NC a un rôle potentiel dans la synthèse du brin d'ARN négatif et des facteurs cellulaires pourrait être nécessaire lors de cette synthèse. Ainsi la fixation de la PTB (polypyrimidine tract-binding protein) sur l'extrémité 3'NC a été décrite à plusieurs reprises (Ito and Lai 1997, Tsuchihara, et al. 1997). Cette fixation aurait lieu sur les épingles à cheveux deux et trois, au niveau d'une séquence équivalente à un site de fixation pour la PTB. Cette interaction pourrait être impliquée dans l'initiation de la réplication du génome.

VII.2. Les protéines virales

(voir figure 6)

VII.2.1. Les protéines structurales

VII.2.1.a. La protéine C

La protéine Core (C) ou de la capsid est la plus conservée parmi les protéines du VHC (Houghton, et al. 1991). Cette protéine basique est très probablement la protéine de capsid du VHC. En effet, la protéine C est détectée dans les particules virales présentes dans les sérums de patients (Ito, et al. 1996, Kaito, et al. 1994). Elle interagirait avec l'ARN viral lors de l'encapsidation pour former la nucléocapsid.

Le gène de la capsid code une protéine de 23 kDa (p23) qui peut, par un clivage alternatif, libérer une forme de 21 kDa (p21) (Hijikata, et al. 1991, Hussy, et al. 1996, Liu, et al. 1997, Lo, et al. 1995, Lo, et al. 1994, Santolini, et al. 1994). Ces deux protéines correspondent respectivement à:

- une forme de 191 aa contenant à l'extrémité-carboxy terminale une zone très hydrophobe (H1). Cette région H1 contiendrait le peptide signal de E1, permettant ainsi sa translocation dans le RE (Santolini, et al. 1994).

- une forme de 173 aa résultant du clivage par une signalase cellulaire de la région H1, entre les aa 173 et 174 (Santolini, et al. 1994, Yasui, et al. 1998).

Par ailleurs, Lo et al. ont également décrit une protéine plus courte, de 16 kDa (p16) (Lo, et al. 1995). Elle possède la même extrémité N-terminale que la p21 mais semble être

dépourvue d'une partie de l'extrémité C-terminale de cette p21. Toutefois, cette forme de 16 kDa n'est pas détectée *in vivo*.

Les deux formes ont une localisation cytoplasmique, associées aux membranes du réticulum endoplasmique. La protéine de 21 kDa a pu également être détectée dans le noyau (Suzuki, et al. 1995). La détection d'une forme de 21 kDa dans les sérums de patients semble confirmer que la p21 est la forme mature de la protéine C. (Yasui, et al. 1998).

Par ailleurs, d'autres auteurs rapportent que les expériences de double marquage ne montrent pas une complète colocalisation de la protéine C et des composants du réticulum endoplasmique. Ils indiquent que des structures, constituées par des compartiments subcellulaires non identifiés, pourraient accumuler la protéine C (Santolini, et al. 1994). Ces structures semblent réagir spécifiquement avec des sérums de patients chroniquement infectés par le VHC (Sansanno and Dammacco 1993). Récemment, Barba *et al.* ont décrit l'association de la protéine de capsid C avec des globules lipidiques (Barba, et al. 1997).

La protéine C semble avoir de nombreuses autres activités biologiques, que ce soit en modulant l'activité de gènes viraux (autres que les siens) ou de gènes cellulaires (Ray, et al. 1995, Zhu, et al. 1998).

Ainsi la transfection de vecteurs exprimant la protéine C dans des cellules d'hépatome entraînerait l'inhibition: de la transcription, de l'assemblage et de la libération du virus de l'hépatite B (VHB) (Shih, et al. 1993).

Selon Ray et al., cette protéine pourrait interagir avec les LTR du VIH-1 et réguler négativement leur activité (Ray, et al. 1995). De même, Kim et al. rapportent que la protéine C pourrait avoir un rôle régulateur sur l'expression du gène cellulaire interféron β [Kim, 1994 #4432].

De très nombreuses études montrent que l'interaction de C avec des facteurs cellulaires pourrait participer à la pathogénicité du VHC:

plusieurs auteurs décrivent une fixation de C sur le LT- β R (lymphotoxin- β Receptor), impliqué dans la transduction du signal de NF- κ B. Cette fixation aggraverait l'activité cytolytique de NF- κ B (Chen, et al. 1997). De plus, en raison de l'implication du LT- β R dans de nombreux mécanismes physiologiques liés au système immunitaire, elle pourrait également produire une large immuno-modulation (Matsumoto, et al. 1997).

l'équipe de Lai décrit l'association spécifique de C avec la hnRNP K (nuclear Ribonucléoprotein K) qui perturbe fortement l'effet inhibiteur de celle-ci sur l'activité du promoteur de la Thymidine Kinase (Hsieh, et al. 1998).

Barba et al. suggèrent que la protéine C perturberait le métabolisme des lipides en régulant les gènes impliqués dans ce processus (Barba, et al. 1997). Cette dérégulation pourrait, selon ces auteurs, être mise en rapport avec les phénomènes de stéatose du foie, caractéristiques d'une infection par le VHC.

un potentiel oncogénique de la protéine C a également été rapporté par plusieurs équipes. En effet, la lignée cellulaire Rat1 exprimant la protéine C, montre toutes les caractéristiques d'une cellule transformée, mais la capacité de C à transformer des cellules primaires reste sujet à controverse (Chang, et al. 1998, Ray, et al. 1996).

enfin, bien que les études actuelles soient aussi très contradictoires, il semble que C soit impliqué dans la modulation de phénomènes apoptotiques induits par le TNF (tumor necrosis factor) (Ray, et al. 1996, Ray, et al. 1998, Zhu, et al. 1998).

Cette interaction de C avec de nombreux facteurs cellulaires pourrait participer à la pathogénicité du virus mais également à l'installation et au maintien de celui-ci dans l'organisme.

VII.2.1.b. Les protéines E1 et E2.

Les protéines E1 et E2 sont considérées comme les deux protéines d'enveloppe du VHC. Ces protéines sont libérées de la polyprotéine par des signalases cellulaires.

- La protéine E1 est une glycoprotéine d'un poids moléculaire apparent de 31 kDa (souche H), dont l'extrémité N terminale est située au niveau de l'aa 192 et l'extrémité C terminale au niveau de l'aa 383 (Fournillier, et al. 1996, Hijikata, et al. 1991).

- La protéine E2 est également une glycoprotéine, d'un poids moléculaire de 70 kDa (souche H), dont les extrémités N et C terminales ont été situées respectivement au niveau des aa 384 et 746 (Hijikata, et al. 1991, Lin, et al. 1994).

Comme nous le verrons en détail dans le chapitre suivant, ces deux protéines peuvent interagir pour former un complexe non-covalent sous sa forme native (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994).

Les protéines E1 et E2 faisant l'objet de notre étude, un chapitre entier leur sera consacré (voir chapitre résultats-discussion).

VII.2.2. *La protéine p7*

Cette protéine, située juste en aval de E2, a été identifiée en 1994 par l'équipe de Rice (Lin, et al. 1994). Il a également été montré qu'elle pouvait faire partie d'une protéine de fusion avec E2 (E2-p7), sans que l'on puisse dire si cette forme est un précurseur de ces deux protéines (Lin, et al. 1994, Mizushima, et al. 1994, Selby, et al. 1994). La fonction de cette protéine reste actuellement inconnue, bien qu'un rôle dans le processus d'assemblage du virus ait été proposé par Mizushima et al. (Mizushima, et al. 1994), par analogie avec la protéine p6 du "semliki forest virus". La p6 est nécessaire pour que le "semliki forest virus" puisse sortir des cellules infectées (Liljeström and Garoff 1991). Il est actuellement impossible de déterminer si p7 du VHC est une protéine structurale ou non-structurale.

VII.2.3. *Les protéines non-structurales*

VII.2.3.a. La protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine de nature hydrophobe de 23 kDa. Ses extrémités N et C terminales correspondent respectivement aux aa 810 et 1026 (Grakoui, et al. 1993, Mizushima, et al. 1994). La protéine NS2 et le tiers amino terminal de NS3 formeraient une autoprotéase qui assurerait le clivage entre NS2 et NS3 au niveau des aa Leu-Ala (aa 1026-1027) (Grakoui, et al. 1993, Hijikata, et al. 1993). Cette activité est dépendante du zinc et le domaine catalytique serait déterminée par les aa His-952 et Cys 993 (Grakoui, et al. 1993, Hijikata, et al. 1993).

VII.2.3.b. La protéine NS3

La protéine NS3 est une protéine de 70 kDa. Ses extrémités N- et C-terminales correspondent respectivement aux aa 1027 et 1657.

Elle est constituée de deux domaines distincts déterminant une double activité:

- L'extrémité N-terminale possède une activité sérine-protéasique (Bartenschlager, et al. 1993, Eckart, et al. 1993, Grakoui, et al. 1993, Tomei, et al. 1993) qui a été localisée par l'équipe de Rice dans les 181 premiers acides aminés de la protéine (Lin, et al. 1994). Plus récemment, l'équipe de Miyamura a mis en évidence le domaine fonctionnel

minimum qui serait composé de 146 aa et compris entre les aa 1059 et 1204 (Yamada, et al. 1998). Cette sérine protéase assure le clivage entre les protéines non-structurales situées en aval: NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A et NS5A-NS5B au niveau d'un site hautement conservé constitué par la séquence Asp/GluXaa₄Cys(Thr)→Ser(Ala) (Eckart, et al. 1993, Grakoui, et al. 1993, Pizzi, et al. 1994)

- L'extrémité C-terminale possède quant à elle une activité hélicase dépendante de l'ARN ainsi qu'une activité NTPasique (Hong, et al. 1996, Kim, et al. 1995, Tai, et al. 1996). Sa structure tridimensionnelle est maintenant connue (Yao, et al. 1997). Cette protéine appartient à la famille des hélicases ARN-dépendantes à « DEAD box ». En effet, la séquence protéique porte huit motifs conservés, caractéristiques des membres de cette famille (Gorbalenya, et al. 1989, Kim, et al. 1997, Koonin 1991). Elle participerait au déroulement de l'ARN génomique au cours de la réplication et à la séparation de duplexes ARN-ARN. Comme pour toutes les hélicases ARN dépendantes, cette activité requiert de l'ATP et des ions divalents tels que le Mg⁺⁺ et le Mn⁺⁺ (Gwack, et al. 1997, Gwack, et al. 1995).

- De plus, des travaux récents ont montré que NS3 interagissait par sa partie N-terminale avec NS5B. Ce complexe fixerait NS4A pour intervenir dans le mécanisme de réplication du génome (Ishido, et al. 1998).

La structure tridimensionnelle de NS3 a été récemment déterminée par cristallographie aux rayons X, et ceci pour la protéine seule (Love, et al. 1998) ou avec le peptide NS4A interagissant avec la partie N-terminale de NS3 (Kim, et al. 1996, Yan, et al. 1998).

VII.2.3.c. La protéine NS4A

NS4A est une protéine de 8 kDa. Ses extrémités N et C terminales correspondent respectivement aux aa 1658 et 1711. Les 54 premiers résidus sont hydrophobes, suivis par une région renfermant un grand nombre d'aa chargés. Ce polypeptide a été défini comme le cofacteur de la sérine protéase NS3, en facilitant les clivages entre les différentes protéines et serait particulièrement importante pour le clivage de la jonction NS4B/NS5A (Bartenschlager, et al. 1994, Failla, et al. 1994, Landro, et al. 1997, Lin, et al. 1994, Lin, et al. 1997). Cette activité de cofacteur s'exercerait aussi bien lors des clivages en cis (NS3/NS4A) (Bartenschlager, et al. 1994, Tomei, et al. 1993) que lors des clivages en trans (c'est à dire, tous les autres sites), par la sérine protéase NS3. La détermination par l'équipe de Thomson de la structure cristalline d'un peptide NS4A interagissant avec la partie N-terminale de NS3 montre que cette interaction

aurait lieu par l'intermédiaire d'une région présente dans la zone hydrophobe des 50 premiers aa de NS3 (Kim, et al. 1996).

La séquence minimum nécessaire à l'activité de cofacteur a été déterminée par Shimizu et al. comme étant constituée par les aa 22 à 31 sur NS4A (Shimizu, et al. 1996).

VII.2.3.d. La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa dont les extrémités N- et C-terminales sont situées respectivement au niveau des aa 1712 et 1972. Sa fonction est encore inconnue à ce jour.

VII.2.3.e. La protéine NS5A

NS5A est une protéine de 58 kDa dont les extrémités N et C terminales sont situées respectivement au niveau des aa 1973 et 2420. Cette protéine est restée longtemps mystérieuse, mais de nombreuses études récentes en ont fait apparaître quelques caractéristiques.

Ainsi, on connaît deux produits correspondant à la protéine NS5A. Ils diffèrent seulement par leur état de phosphorylation: une protéine de 56 kDa, phosphorylée, et une protéine de 58 kDa, hyperphosphorylée (Asabe, et al. 1997, Kaneko, et al. 1994). Ces deux protéines possèdent des résidus sérine phosphorylés localisés dans la partie C-terminale de la protéine (Asabe, et al. 1997). Cette phosphorylation a lieu grâce à une interaction avec une protéine kinase non encore identifiée (Ide, et al. 1997, Reed, et al. 1997). Cette phosphorylation pourrait être un élément indispensable au cycle répliatif puisque cette caractéristique est retrouvée chez deux autres membres de la famille des flaviviridae, le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et le virus de la fièvre jaune (YF) (protéine NS5) qui appartiennent respectivement aux genres des pestivirus et des Flavivirus (Reed, et al. 1998).

Plusieurs études suggèrent que cette protéine posséderait une propriété d'activateur transcriptionnel qui, en modulant les fonctions de la cellule hôte, pourrait avoir un rôle important dans la répliation virale et la carcinogénèse (Chung, et al. 1997, Kato, et al. 1997).

Enfin, il convient de signaler qu'une séquence responsable de la résistance au traitement par l'interféron- α a été définie par l'équipe d'Enomoto comme faisant partie de cette protéine. Il s'agit de la région déterminant la résistance à l'interféron (ou ISDR) (Enomoto, et al. 1995,

Enomoto, et al. 1996, Enomoto, et al. 1996). Les auteurs la situent entre les aa 2209 et 2248. Cette séquence a été déterminée par séquençage direct puis comparaison des séquences des génomes viraux chez des patients qui présentaient des populations majoritairement sensibles avant traitement devenant résistantes au cours du traitement. Cette séquence a tout d'abord été déterminée pour le génotype 1b puis appliquée aux génotypes 2a et 2b. Ainsi, il a été déterminé une séquence "prototype" correspondant à la séquence de HCV-J ("wild type"), qui définit la résistance à l'interféron. Lorsque la séquence d'un génome viral au niveau de l'ISDR diffère de plus de trois aa par rapport à ce prototype, les auteurs considèrent que ce virus peut être considéré comme sensible à l'interféron. Néanmoins, des équipes européennes ont réalisé des études similaires sans retrouver cette corrélation (Khorsi, et al. 1997, Squadrito, et al. 1997, Zeuzem, et al. 1997), alors que d'autres groupes Japonais ont confirmé les travaux d'Enomoto avec des résultats moins absolus (Kurosaki, et al. 1997).

D'autre part, les travaux réalisés par l'équipe de Katze suggèrent que la résistance à l'interféron passe par une répression de l'activité de la PKR par la protéine NS5A [Gale, 1998 #503; Gale, 1998 #504]. Cette répression nécessite la formation d'un complexe PKR-NS5A. Cette association serait empêchée lorsque la région ISDR porte plusieurs mutations, entraînant alors un caractère sensible à l'interféron de cette souche du VHC.

Enfin, une séquence d'aa chargés positivement (DPRKKRTVV), caractéristique d'un signal de localisation nucléaire, a été mise en évidence sur la protéine. Ce signal de localisation nucléaire est fonctionnel; pourtant, une étude immunohistochimique montre que la protéine reste localisée au niveau du cytoplasme (Ide, et al. 1996). Ce signal de localisation nucléaire ne pouvant diriger la protéine vers le noyau que lorsque la protéine est déletée de sa partie C-terminale, on peut s'interroger sur la signification biologique d'une telle séquence ou d'une telle délétion.

VII.2.3.f. La protéine NS5B

NS5B est une protéine hydrophile de 68 kDa dont les extrémités N et C terminales sont situées respectivement au niveau des aa 2421 et 3011.

La présence sur la protéine du motif Gly-Asp-Asp, caractéristique des ARN polymérase ARN-dépendantes, suggère fortement qu'elle porterait la fonction de polymérase virale (Ishihama and Barbier 1994, Kamer and Argos 1984). Hwang et al. montrent que cette protéine est phosphorylée et localisée dans la région périnucléaire, probablement associée avec

la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique ou le complexe Golgien (Hwang, et al. 1997).

VIII. Notion de variabilité génomique

Comme pour tous les virus à ARN brin positif, l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC ne posséderait pas d'activité 3'-5' exonucléasique et serait donc incapable de réparer l'ARN lors de l'incorporation erronée d'une base. Ce phénomène entraîne l'apparition de variants, connus sous le nom de quasi-espèces (Martell, et al. 1992, Martell, et al. 1994). Il est aujourd'hui admis qu'un virus ancestral existe depuis plus de 500 ans. Cette variabilité a alors entraîné l'émergence des différents génotypes et sous-types que nous connaissons actuellement (Smith, et al. 1997). Cette émergence s'est produite au gré d'évènements historiques tels que les guerres contemporaines, les injections multiples avant la généralisation du matériel à usage unique, le développement de la transfusion dans les années 50 et la propagation de la toxicomanie intraveineuse.

Cette variabilité génomique pose de sérieux problèmes de classification.

La classification en différents génotypes a été établie selon le degré d'homologie de séquence, les génomes viraux ayant plus de 80% d'homologie appartiennent au même génotype. Néanmoins, un grand nombre de classifications sont proposées par différentes équipes et il n'y a actuellement toujours pas de consensus (voir tableau 1). La plus utilisée est la classification de Simmonds et al., réalisée sur la base des séquences nucléotidiques de l'extrémité 5' et des gènes codants pour les protéines C, NS3 et NS5. Les génotypes y sont désignés par des chiffres (1,2,3..) selon l'ordre de leur découverte, et les sous-types par des lettres (a,b,c..). Par cette classification, on distingue aujourd'hui six génotypes et plus de 11 sous-types (Simmonds, et al. 1993).

Ces variations n'apparaissent pas de façon homogène sur le génome. Ainsi, tandis que la région 5'NC est très conservée, les 50 premiers nucléotides de la région 3' non-codante montrent une grande variabilité génomique entre les différentes souches (Han and Houghton 1992). La région codant pour les protéines E1 et E2 est la plus variable (Weiner, et al. 1991). Ainsi, il a été montré que la protéine E2 possédait deux régions hypervariables, nommées HVRI (390-410) et HVRII (474-480) (Higashi, et al. 1993, Hijikata, et al. 1991, Weiner, et al. 1992). Bien que cela soit moins documenté, la présence d'une telle région dans E1 a également été rapportée.

| Isolat | Chan | Okamoto | Bukh | Simmonds | Cha | Enomoto |
|---------------|------|---------|--------|----------|-----|---------|
| HCV-I | 1a | I | I/1a | 1a | I | K-PT |
| HCV-J, BK | 1b | II | II/1b | 1b | II | K1 |
| EG-28 | nc | nc | 1c | 1c | nc | nc |
| HC J6 | 2a | III | III/2a | 2a | III | K2a |
| HC J8 | 2b | IV | IV/2b | 2b | III | K2b |
| T0994 | nc | nc | 2c | 2c | III | nc |
| E-b1, Ta | 3 | V | V/3a | 3a | IV | nc |
| Tb | nc | VI | 3b | 3b | IV | nc |
| EG-16, 29, 33 | 4 | nc | 4a | 4a | nc | nc |
| | nc | nc | 4b | nc | nc | nc |
| | nc | nc | 4c | nc | nc | nc |
| | nc | nc | 4d | nc | nc | nc |
| | nc | nc | 4e | nc | nc | nc |
| | nc | nc | 4f | nc | nc | nc |
| SA-1, 7, 11 | nc | nc | 5a | 5a | V | nc |
| HK-1, 2, 3, 4 | nc | nc | 6a | 6a | nc | nc |

Tableau I: Différentes classifications des types et sous types génomiques du virus de l'hépatite C.

Chan et al., (1992); Okamoto et al., (1992); Simmonds et al., (1993); Bukh et al., (1994); Cha et al., (1992); Enomoto et al., (1990);

nc: non classifié

On sait aujourd'hui que ces variations apparaissent au niveau du génome viral au cours du temps chez les patients infectés. Plusieurs génotypes peuvent être mis en évidence chez le même malade (Farci, et al. 1994, Higashi, et al. 1993, Li, et al. 1991). Une hétérogénéité de la région HVRI peut être ainsi observée chez un patient à différents stades de sa maladie (Kato, et al. 1994) (pour plus de détails, voir "La protéine E2", chapitre résultat-discussion).

VIII.1. Génotypes et prévalence

La prévalence de ces différents génotypes est très différente d'une région du globe à l'autre (Cha, et al. 1992, Mcomish, et al. 1994, Takada, et al. 1992). De nombreuses études permettent de situer leurs implantations majeures.

- le génotype 1a est très présent aux Etats-Unis et en République Dominicaine.

(Mcomish, et al. 1994, Nishizono, et al. 1997)

- le génotype 1b est prédominant au Japon, à Taiwan, dans certains pays de l'ex URSS (Russie, Biélorussie, Moldavie, Ouzbékistan, Croatie), en Espagne et au Maroc.

(Benani, et al. 1997, Kato, et al. 1991, Lopez, et al. 1997, Viazov, et al. 1997, Vince, et al. 1998, Wu, et al. 1997)

- le génotype 2 est fréquemment rencontré en Europe et en Indonésie

(Li, et al. 1991, Nousbaum 1998)

- le génotype 3, rencontré en Europe, est très présent en Asie (Inde, Pakistan, Thaïlande) (Cha, et al. 1992, Hotta, et al. 1997, Shah, et al. 1997)

- les génotypes 3c et 3f ne sont rencontrés qu'au Népal (Mcomish, et al. 1994).

- le génotype 4 est dominant en Afrique centrale, en Afrique du nord et au Moyen Orient.

(Nousbaum 1998, Simmonds, et al. 1993)

- le génotype 5 est celui qui est le plus rencontré en Afrique du sud

(Mcomish, et al. 1994, Simmonds, et al. 1993)

- le génotype 6 est restreint à l'Asie du sud-est et notamment à Taiwan.

(Nousbaum 1998, Simmonds, et al. 1993)

VIII.2. Génotype et mode de transmission

Un génotype a souvent été associé à un mode de transmission. Ainsi, dans les pays développés d'Europe de l'ouest, le sous-type 1b semble associé à la transmission transfusionnelle et aux hépatites C de causes inconnues, alors que les toxicomanies intraveineuses seraient plutôt associées aux sous-types 3a et 1a (Basaras, et al. 1997, Kleter, et al. 1998, Nousbaum, et al. 1995, Pawlotsky, et al. 1995, Silini, et al. 1995).

VIII.3. Influence du génotype sur plusieurs paramètres de l'infection

- Il est maintenant bien établi que la réponse au traitement par l'interféron α est fortement influencée par le génotype du virus; un malade infecté par le génotype 1 répond significativement moins bien que les patients infectés par d'autres génotypes (Davis and Lau 1997, Nousbaum, et al. 1995, Pawlotsky, et al. 1996). L'existence d'une différence entre les génotypes 1a et 1b reste sujet à discussion (Pawlotsky, et al. 1996). De même, l'influence réelle de la séquence de la région déterminant la sensibilité à l'interféron (ISDR), présente sur la protéine NS5A, est toujours controversée (Enomoto, et al. 1995, Gale, et al. 1997, Khorsi, et al. 1997, Pawlotsky, et al. 1998). C'est également le cas pour les extrémités 5' et 3'NC: aucune corrélation directe entre les variations de séquence de ces extrémités et la résistance à l'interféron n'a pu être établie (Khorsi, et al. 1998, Yamamoto, et al. 1997). Les variations de séquence entre les génomes viraux sensibles ou résistants à l'interféron sont sans doute réparties sur l'ensemble du génome.

- Un certain nombre d'études suggèrent que le génotype pourrait être lié à l'établissement de la chronicité et à la sévérité de la maladie (Amoroso, et al. 1998, Mcomish, et al. 1993, Pozzato, et al. 1994, Pozzato, et al. 1991, Silini, et al. 1995), mais il faut prendre en compte l'existence possible de biais épidémiologiques tels que l'âge et l'ancienneté de la maladie.

IX. Un vaccin contre l'hépatite C: Espoirs et difficultés

Comme on l'a vu précédemment, les traitements actuellement disponibles sont très inefficaces. Or, le nombre de cas recensés est en constante augmentation et le contrôle de l'infection est rendu très difficile par le fait que dans 40% des cas, le mode de contamination reste inconnu. La mise au point d'un vaccin constitue donc une priorité pour la recherche contre le VHC.

IX.1. Les obstacles

Néanmoins, le développement de ce vaccin se heurte à de nombreux obstacles.

Tout d'abord, il n'existe pas de système de culture apte à répliquer efficacement le virus. Cela rend très difficile l'étude des propriétés biologiques du VHC, comme la morphogénèse et la pathogénèse. Les quelques connaissances disponibles ont été obtenues par l'expérimentation sur l'animal et le suivi de patients. Malheureusement, le seul modèle animal disponible, pouvant développer l'hépatite C, est le chimpanzé. Son utilisation est très contrôlée et les caractéristiques de la réponse immunitaire induite par le virus sont sensiblement différentes de celles observées chez l'homme. Aussi, bien qu'une résolution spontanée de l'infection intervienne dans 20% des cas chez les patients, il n'est toujours pas possible de l'analyser et de la reproduire artificiellement.

Une seconde difficulté est apportée par la présence sur les protéines d'enveloppe des zones hypervariables (voir I.1.2, chapitre résultats-discussion). Une réponse humorale importante est exercée contre ces zones hypervariables mais les anticorps produits ne peuvent être neutralisants que pour une quasi-espèce donnée. L'apparition de nouvelles quasi-espèces ayant lieu en continu, sous la pression de sélection induite par les anticorps neutralisants, on comprend que le virus puisse échapper au contrôle du système immunitaire. Le développement d'un vaccin passe donc avant tout par l'induction d'une réponse immune dirigée contre le plus grand nombre possible de quasi-espèces, de sous-types, voire de génotypes. Ceci reste pour l'instant irrésolu.

Enfin, une des caractéristiques du virus rend encore plus importante sa capacité à échapper au système immunitaire et à s'installer dans l'organisme infecté. En effet, le VHC serait capable d'infecter les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Elles serviraient donc de « réservoir » pour le virus. Néanmoins, le problème du tropisme extrahépatique du virus reste sujet à polémique (pour revue, voir (Lerat and Inchauspé 1997)).

IX.2. Les espoirs et les stratégies

Pourtant, malgré ces difficultés, la conception d'un vaccin reste envisageable; les caractéristiques de la maladie et les avancées réalisées ces dernières années en témoignent.

En effet, l'infection par le virus de l'hépatite C déclenche une réaction immunitaire, humorale et cellulaire, suffisante dans 20% des cas, pour éliminer le virus de l'organisme. Il existe donc une protection naturelle contre le VHC dont il reste à élucider les mécanismes.

De plus, bien que les recherches soient ralenties par l'absence d'un système de culture permettant la réplication et la multiplication virale, on dispose aujourd'hui de nombreuses informations et d'outils pour étudier le virus. Ainsi, depuis 1989, le virus responsable de la maladie a été isolé (Choo, et al. 1989) et très récemment, l'ADNc infectieux a été obtenu et validé pour sa capacité à induire une hépatite C chez le chimpanzé (Kolykhalov, et al. 1997, Yanagi, et al. 1997).

Depuis que le virus a été isolé, un très grand nombre d'essais vaccinaux ont été réalisés. Les premiers antigènes utilisés pour les vaccinations ont été les glycoprotéines E1 et E2 qui constituent vraisemblablement l'enveloppe de la particule virale.

C'est ainsi que les premières expériences réalisées chez le chimpanzé par Choo et al., ont donné des résultats encourageants (Choo, et al. 1994). Les glycoprotéines E1 et E2 coexprimées à l'aide du virus vaccine sur des cellules HeLa ont été purifiées et utilisées pour vacciner les chimpanzés. Sur les sept chimpanzés vaccinés, cinq étaient alors protégés contre une faible dose d'épreuve de la souche homologue. Les deux autres ont développé une hépatite aiguë qui a évolué spontanément vers la guérison. Malheureusement, les cinq chimpanzés protégés contre une faible dose d'épreuve ont tous développé une hépatite C lorsqu'ils ont été soumis à une dose d'épreuve plus forte ou exposés à une souche de sous-type différent (mais du même génotype). La réponse immune ainsi mise en jeu par la vaccination est donc faible et spécifique de souche.

La faible efficacité de la réponse immunitaire peut s'expliquer en partie par la variabilité antigénique du VHC. Elle est particulièrement imputable aux régions hypervariables présentes sur la protéine E2. Pourtant, des anticorps neutralisants sont produits contre ces régions hypervariables comme cela a été montré par plusieurs auteurs (Farci, et al. 1994, Zibert, et al. 1995). De nombreux travaux (Farci, et al. 1994, Farci, et al. 1996, Krawczynski, et al. 1996) ont montré qu'il était possible d'initier une immunité protectrice chez l'animal en induisant la production d'anticorps neutralisants. Pourtant, ceux-ci présentent toujours une spécificité d'action très étroite rendant impossible une large protection croisée.

Le faible spectre d'action des anticorps neutralisants représente donc un obstacle supplémentaire à l'élaboration d'un vaccin. Afin d'apporter une possible solution à ce problème, Puntoriero et al. proposent d'utiliser des "mimotopes" lors de l'étape de vaccination (Puntoriero, et al. 1998). Comme cela est expliqué en détail page 33, cette stratégie semble fournir un espoir pour la mise au point d'un éventuel vaccin.

La faible efficacité de la réponse immunitaire est également probablement à mettre en rapport avec l'état conformationnel des antigènes utilisés. En effet, les méthodes de purification

employées pour la préparation des antigènes favorisent la dénaturation des structures tridimensionnelles des protéines. Les antigènes utilisés sont donc probablement partiellement dénaturés. Il est donc particulièrement important de pouvoir produire des glycoprotéines E1 et E2 dans un état conformationnel le plus proche possible de l'état natif.

Un autre espoir est représenté par les vaccins à base d'"ADN nu". Le principe consiste à injecter un vecteur plasmidique, exprimant les gènes d'intérêt, en intradermique ou intramusculaire. Les protéines virales vont donc être exprimées de façon endogène, dans la cellule, selon un processus permettant d'obtenir des protéines sous une forme la plus native possible, sans recourir à des intermédiaires de purification.

Les vecteurs plasmidiques contiennent des séquences codant pour les protéines d'intérêt qui sont placées sous la dépendance d'un promoteur fort (CMV), ce qui permet ensuite la transcription de ces séquences et la traduction de ces gènes dans la cellule. Ces protéines virales seront ensuite processées par la machinerie cellulaire en vue de leur présentation au système immunitaire.

Des résultats encourageants ont été obtenus dans le cas des infections par le virus de la grippe. Il a été possible de neutraliser des infections provoquées par des souches homologues ou hétérologues. Ce type de procédure a été récemment appliqué au VHC par plusieurs équipes (Inchauspe, et al. 1997, Wang, et al. 1996). Ainsi, l'équipe d'Inchauspe et al. a réalisé des injections de plasmides codant la protéine C ou la protéine E2. Une réponse humorale satisfaisante a été obtenue, ainsi qu'une réponse de type cellulaire, contre des déterminants du VHC. Bien que les différents paramètres de l'expérience nécessitent d'être contrôlés et améliorés (mode d'injection, sélection des épitopes, sécurité du protocole) cette stratégie pourrait être tout à fait exploitable dans le cas du VHC (Inchauspe, et al. 1997).

Enfin, le complexe non-covalent, formé par les glycoprotéines E1 et E2 du VHC représente un candidat potentiel fort intéressant pour la production d'un vaccin qui induirait la production d'anticorps neutralisants.

Ce complexe est actuellement étudié par notre équipe. Cependant, il conviendrait d'obtenir des complexes correctement repliés et exprimés à la surface cellulaire ou sécrétés afin que leur purification en soit aisée. Les résultats déjà obtenus sont encourageants, et représentent une base prometteuse pour l'obtention d'un futur vaccin.

Résultats-Discussion

I. Etude des séquences de rétention à la membrane du RE des glycoprotéines E1 et E2

I.1. Introduction

I.1.1. La protéine E1

Elle est considérée comme l'une des deux protéines d'enveloppe du VHC. C'est une glycoprotéine dont le poids moléculaire estimé varie entre 31 et 35 kDa selon les études. Il dépend de la souche étudiée et du système d'expression employé (Grakoui, et al. 1993, Hijikata, et al. 1991, Lanford, et al. 1993, Matsuura, et al. 1992, Ralston, et al. 1993). La souche que nous avons utilisée dans les études qui vont suivre est la souche Hutchinson (H). La masse moléculaire apparente de la protéine E1 mature correspondante est de 31 kDa. Son extrémité N-terminale a été localisée au niveau de l'aa Tyr¹⁹² (Fournillier, et al. 1996, Hijikata, et al. 1991).

La séquence en aa de la protéine E1 est peu conservée entre les différents isolats. Elle porte par ailleurs une région hypervariable (HVR) très mal connue (Bukh, et al. 1993, Kato, et al. 1992).

La séquence des aa 174 à 191 est considérée comme étant le peptide signal de E1 nécessaire à sa translocation dans le réticulum endoplasmique (RE). Il est clivé en amont et en aval par une signalase cellulaire (Santolini, et al. 1994).

En plus de la forme E1 de 31 kDa, une forme de 35 kDa a également été décrite à plusieurs reprises (Lanford, et al. 1993, Ralston, et al. 1993). Une étude de Fournillier-Jacob et al. (Fournillier, et al. 1996) montre que cette apparente contradiction est probablement due à l'étendue de la séquence exprimée. En effet, lorsque la séquence putative de E1 est exprimée seule (174-370) ou en présence de celle de la capsid (1-370), on observe une taille apparente de la protéine de 35 kDa. Par contre, on peut détecter la forme de 31 kDa lorsque la séquence E1 (174-370) est flanquée des 40 aa C-terminaux de la séquence de la capsid et des 13 aa du peptide signal de la protéine E2. Cela suggère que la maturation correcte de E1 requiert la co-expression en *cis* de ces séquences flanquantes. Cela a déjà été mentionné dans d'autres études comme celle de Matsuura et al. (Matsuura, et al. 1994) qui proposent un modèle rendant compte de ces interactions au cours de la traduction.

De plus, l'étude de Fournillier-Jacob suggère fortement que le processing de la polyprotéine n'entraîne pas un clivage entre E1 et le peptide signal de E2, mais que celui-ci fait partie de la protéine E1 mature. L'acide aminé C-terminal de la protéine E1 serait donc très probablement l'Alanine 383. Il a été alors suggéré que le domaine hydrophobe à l'extrémité C-terminale de E1 pourrait jouer le rôle de séquence signal pour la protéine E2 tout en permettant l'ancrage de la protéine E1 au niveau des membranes du RE (voir figure 11).

En outre, l'étude de la séquence en aa montre que la protéine E1 porte respectivement cinq et six sites potentiels de glycosylation pour les souches H (génotype 1a) et BK (génotype 1b). La glycosylation de la protéine E1 de la souche H du VHC sera abordée en détail dans la troisième partie de ce mémoire de thèse.

I.1.2. La protéine E2

Ce serait donc la deuxième protéine d'enveloppe du VHC (Houghton, et al. 1991). C'est une glycoprotéine dont le poids moléculaire est 70 kDa (souche H). Elle porte, pour cette même souche, 11 sites potentiels de glycosylation, déduits des séquences publiées. Les extrémités N et C-terminales sont situées respectivement au niveau des aa 384 et 746 (voir figure 11) (Lin, et al. 1994).

Néanmoins, deux formes stables contenant la séquence de E2 ont été décrites: la forme dont nous venons de parler (384-746) et une forme comprenant en plus la séquence en aa de 747 à 809, correspondant à la protéine p7 (forme E2-p7: aa 384 à 809) (Lin, et al. 1994, Mizushima, et al. 1994). La présence conjointe des protéines E2 et E2-p7, pour la souche H du VHC, résulterait d'un clivage inefficace au site E2/p7 par les signalases cellulaires. D'après Lin et al., cette inefficacité pourrait être due à la séquence présente au niveau du site E2/p7 (Lin, et al. 1994, Von Heijne 1986). Le clivage serait plus efficace pour la souche 1b. Bien que plusieurs théories concernant ces deux formes soient proposées par les auteurs, la signification de leur co-expression reste à déterminer.

Deux régions situées dans la partie N-terminale de E2 présentent une grande variabilité de séquence. C'est la plus importante de tout le génome du VHC. Elle sont décrites comme étant les régions hypervariables HVRI (390-410) et HVRII (474-480) (Hijikata, et al. 1991, Weiner, et al. 1991) (voir figure 12). De très nombreuses études se sont attachées à déterminer les caractéristiques et les fonctions de HVRI, principalement. Cette séquence présente une

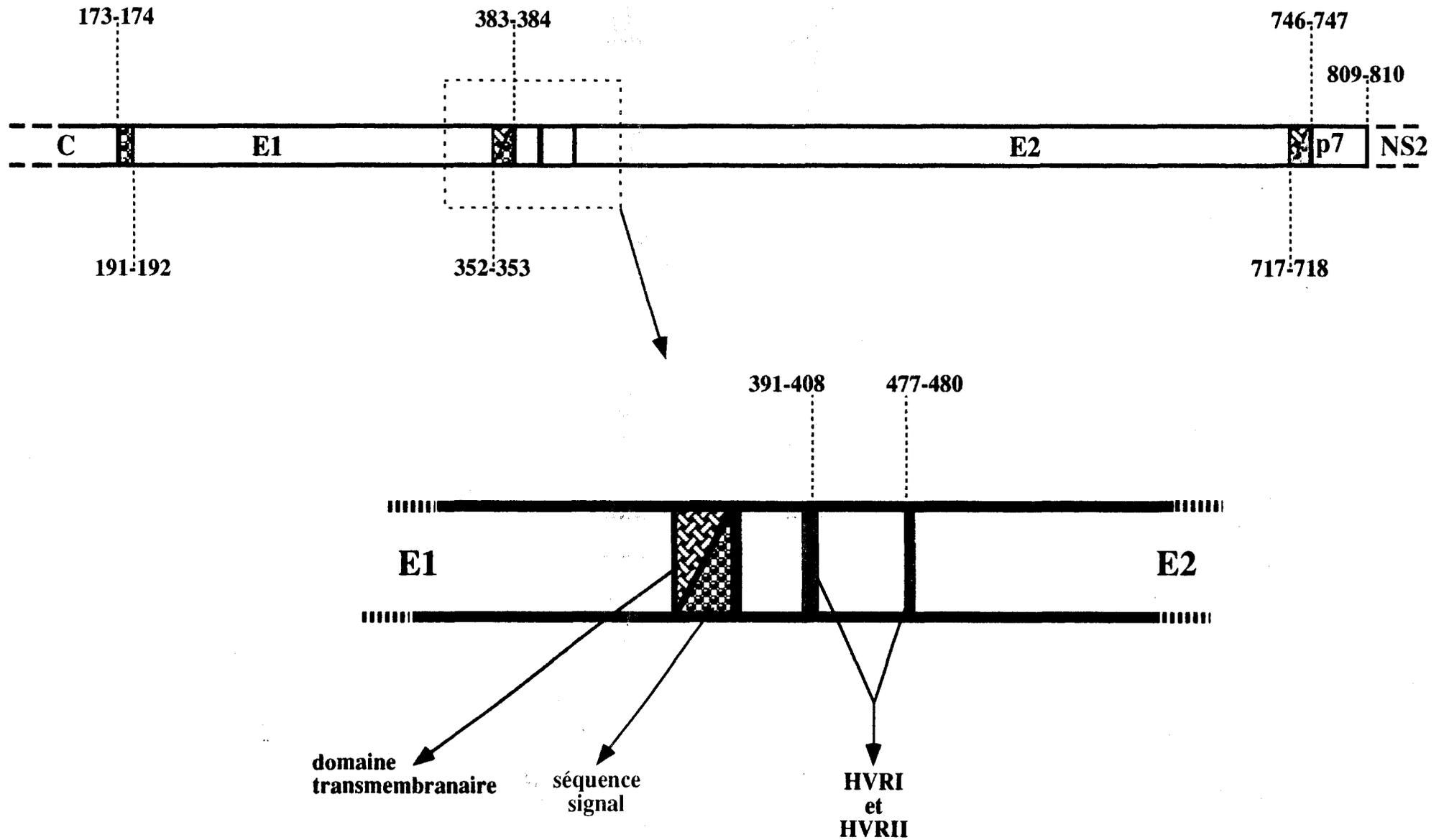


Figure 11 : Organisation de la région des protéines E1-E2 du VHC

grande variabilité au cours de l'infection chronique par le VHC (Kurosaki, et al. 1993), mais également à un temps donné pour les virus présents chez un même patient (Kato, et al. 1992, Tanaka, et al. 1992). La proportion des différents variants change également au cours de l'infection (Higashi, et al. 1993). De plus, cette variation tend à s'accélérer au fur et à mesure que la pathologie progresse alors que le taux de variation est faible lors de l'infection aiguë (Nakazawa, et al. 1994, Okamoto, et al. 1992, Sakamoto, et al. 1994, Weiner, et al. 1993). Ces éléments tendent à montrer que la modulation continue de la séquence de HVRI participerait à un mécanisme d'échappement du virus à la réponse immunitaire et serait responsable de l'infection chronique.

En effet, une forte réponse humorale est dirigée contre les sites antigéniques déterminés par HVRI lors de l'infection et on détecte des anticorps dirigés contre cette région chez la majorité des patients virémiques (Zibert, et al. 1995). Un effet neutralisant des anticorps contre HVRI a d'ailleurs été rapporté par plusieurs auteurs. La neutralisation du virus par des Ac neutralisants empêcherait l'attachement d'un virus sur des cellules (Shimizu, et al. 1994, Zibert, et al. 1995). De même, l'effet protecteur contre l'infection par VHC, d'un sérum contenant des Ac anti-HVR a pu être montré chez le chimpanzé (Farci, et al. 1996). Malheureusement, cet effet protecteur reste limité au variant contre lequel les Ac sont produits et il n'a pas encore été décrit de larges protections croisées.

Cependant, une solution à ce problème est proposée par Puntoriero et al. (Puntoriero, et al. 1998). Une banque de phages M13 exprimant un vaste répertoire de séquences peptidiques correspondant à la région HVRI a été construite. Ces peptides ont la propriété de se comporter comme des mimotopes, c'est à dire que, sans avoir forcément une séquence correspondant à celle de HVRI, ils miment la présentation des épitopes naturels pour l'interaction avec les anticorps. Les mimotopes présentant la plus grande réactivité croisée avec les sérums de patients ont été étudiés chez la souris. Les anticorps alors produits reconnaissent tous les variants de HVRI ayant présenté une réaction croisée avec les mimotopes sélectionnés. Cette étude, ainsi que celle de McAllister et al. suggèrent par ailleurs que la variabilité des aa de HVRI n'aurait pas lieu au hasard, mais que quelques aa seulement seraient particulièrement concernés par ce phénomène (McAllister, et al. 1998, Puntoriero, et al. 1998). Ceci indique que des contraintes, fonctionnelles ou structurelles, s'exerçant sur les aa, existent dans cette région.

De nombreuses études suggèrent que la variation de HVRI serait en fait directement liée à la réponse humorale et que l'apparition séquentielle des anticorps contre les variants entraînerait l'apparition de nouveaux variants (Higashi, et al. 1993, Kumar, et al. 1994, Taniguchi, et al. 1993, Vandoorn, et al. 1995, Weiner, et al. 1992, Zibert, et al. 1997). Ainsi, seule une faible variabilité de HVRI est observée durant l'infection chez un patient ou un

chimpanzé immunodéprimé (Kumar, et al. 1994, Shimizu, et al. 1997). De même, il n'y a pas émergence d'une quasi espèce majoritaire pour un virus propagé *in-vitro* (Ito, et al. 1996).

Pourtant, en raison de l'absence d'un système de culture cellulaire permettant une réplication efficace du virus, aucune preuve directe n'a pu confirmer cette théorie.

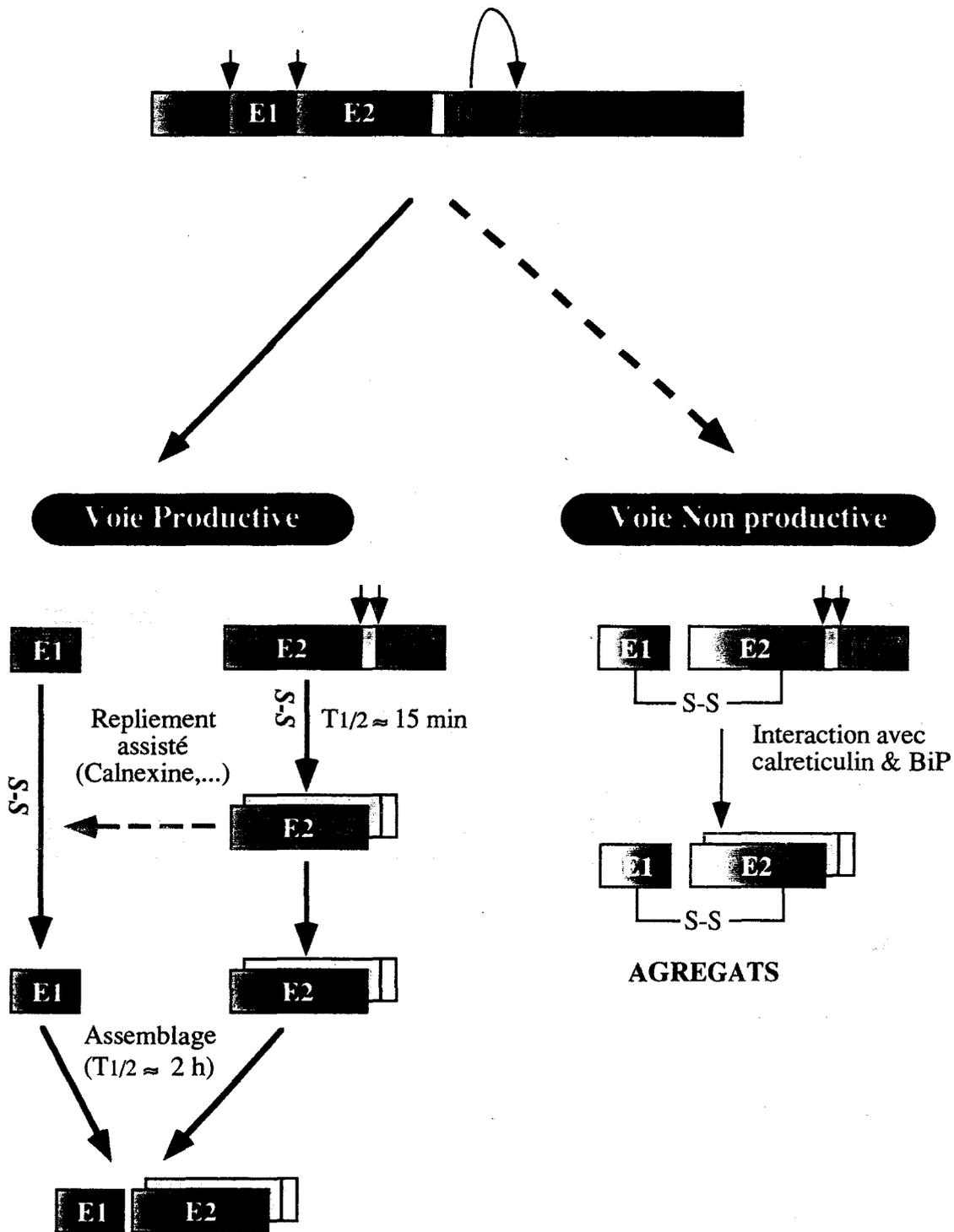
Comme cela a été décrit pour la protéine E1, E2 possède à son extrémité C-terminale une région très hydrophobe. Cette séquence pourrait selon Lin et al. permettre la translocation de la protéine p7 dans le RE. Ce phénomène semble analogue à celui rencontré pour la protéine E1 (voir page 32). De plus, comme pour E1, cette région pourrait jouer le rôle d'ancrage de la protéine E2 à la membrane du RE (Grakoui, et al. 1993, Ralston, et al. 1993). Les expériences réalisées par Cocquerel et al. ont confirmé cette hypothèse (Cocquerel, et al. 1998). Les 29 aa C-terminaux de la protéine E2 constituent une séquence de rétention de la protéine à la membrane du RE (voir détails page 49).

I.1.3. *Interaction des protéines E1 et E2*

De nombreuses études ont montré que les protéines E1 et E2 interagissent pour former des complexes qui sont probablement des sous-unités fonctionnelles de la particule du VHC. De nombreux systèmes d'expression ont été utilisés par les différents auteurs pour mettre en évidence l'existence de ces complexes: expression des protéines en système acellulaire, en cellules d'insectes (Lanford, et al. 1993) et en cellules de mammifères infectées par des baculovirus, des virus vaccine ou Sindbis recombinants (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994, Grakoui, et al. 1993, Ralston, et al. 1993).

Les résultats obtenus ont tout d'abord donné lieu à une controverse en ce qui concerne le mode de formation des complexes: pour certains auteurs, l'association des protéines avait lieu de façon covalente (Grakoui, et al. 1993), pour d'autres, elle avait lieu de façon non-covalente (Matsuura, et al. 1994, Ralston, et al. 1993). Une étude réalisée par Dubuisson et al. montre que les deux formes sont effectivement détectées. En présence de détergeant non-ionique, deux types de complexes sont formés: un hétérodimère E1-E2 stabilisé par des liaisons non-covalentes qui représente le complexe natif, et des agrégats hétérogènes associés par des ponts disulfures intermoléculaires constitués de protéines mal repliées (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994, Dubuisson and Rice 1996).

Figure 12 : Voies de repliement des protéines E1 et E2 du VHC



HETERODIMERE NON-COVALENT

(Complexe de Prébourgeoisement)

I.1.3.a. L'anticorps H2

Ce travail a été rendu possible grâce à l'obtention d'un anticorps monoclonal capable de réagir avec des complexes E1E2. Cet anticorps monoclonal, appelé H2, est dépendant de la conformation. Il reconnaît un épitope sur E2 et permet la coprécipitation des complexes E1E2, correctement repliés et non-covalents.

Le complexe E1E2 non-covalent constitue probablement le complexe natif, c'est à dire la forme de « prébourgeonnement » du complexe glycoprotéique (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994).

I.1.3.b. Le complexe E1E2

La formation du complexe natif E1E2 est inefficace. Il a été montré que 95% des protéines E1 et E2 synthétisées sont retrouvées sous la forme d'agrégats (voir figure 12) (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson and Rice 1996). Ceci ne semble pas résulter de mutations présentes sur le clone utilisé. En effet, l'utilisation du clone infectieux récemment caractérisé par Kolykhalov et al. (Kolykhalov, et al. 1997) a entraîné le même type de résultats (Dubuisson et Kolykhalov, résultats non publiés). Les systèmes d'expression utilisés, qui donnent lieu à de très hauts niveaux d'expression, ne semblent pas non plus être à l'origine de ce phénomène. Ainsi, les résultats obtenus sur la lignée Moradpour (Moradpour, et al. 1998), une lignée cellulaire inductible permettant l'expression des protéines structurales et non-structurales du VHC, ont permis de montrer que les agrégats sont également produits dans ces cellules (Dubuisson et Moradpour, résultats non publiés). Ces éléments suggèrent que ce phénomène d'aggrégation pourrait être également retrouvé au niveau des cellules infectées chez les patients. Il pourrait correspondre à un mécanisme inhérent au VHC, lui permettant de réduire sa pathogénicité en réduisant sa multiplication, augmentant ainsi sa capacité à s'installer et à se maintenir dans l'organisme.

L'association des protéines E1 et E2 dans la formation du complexe natif est lente. La formation de cet hétérodimère nécessite très probablement, comme cela a pu être montré dans d'autres systèmes, que les protéines E1 et E2 soient elles-mêmes correctement repliées, au moins partiellement, avant qu'elles ne puissent s'associer.

Par ailleurs, il a été montré que la formation des ponts disulfures intramoléculaires de E1 est lente alors que la formation des ponts disulfures intramoléculaires de E2 est très rapide (Dubuisson and Rice 1996).

De plus, il apparaît qu'en l'absence de E2, la forme oxydée de E1 n'est jamais détectée. La présence en cis ou en trans de la protéine E2 dans son intégrité étant nécessaire au repliement de la protéine E1, il a été suggéré que E2 joue le rôle de « chaperon » pour la protéine E1 (Michalak, et al. 1997). L'interaction, très précoce, de E2 avec E1 favoriserait le repliement correct de celle-ci en l'empêchant d'interagir avec elle-même ou d'autres protéines pour mener à la formation d'agrégats irréversibles. Cette interaction nécessite, au préalable, un repliement partiel de la protéine E2, qui a lieu dès la fin de la synthèse, assisté par la calnexine (voir page 39). Ce prérequis entraîne donc un délai dans l'association de E2 avec E1, ce qui pourrait expliquer le retard observé dans la formation des ponts disulfures intramoléculaires de E1.

I.1.3.c. Séquences impliquées dans l'interaction des Glycoprotéines E1 et E2

Les travaux destinés à mettre en évidence les domaines des protéines impliqués dans l'interaction sont actuellement contradictoires. Selby a montré qu'une délétion de l'extrémité C-terminale de E2 à partir de l'aa 715 inhibe la coprécipitation. Celle-ci n'est pas augmentée quand la séquence au delà de l'aa 730 est présente. Aussi, il conclut que la région C-terminale 715-730 est indispensable à la formation de l'hétérodimère (Selby, et al. 1994).

Matsuura et al. ont étudié des formes de E1 et E2 tronquées aux extrémités C-terminales et délétées des régions hydrophobes internes, susceptibles d'entraîner des rétentions artefactuelles. Ils observent néanmoins une coprécipitation des protéines. Ils suggèrent donc que les protéines E1 et E2 s'associent par leurs extrémités N-terminales (Matsuura, et al. 1994). Ils signalent par ailleurs que ces formes sont sécrétées et retrouvées associées dans le surnageant de culture.

Des travaux analogues ont été réalisés par Michalak et al. (Michalak, et al. 1997). L'utilisation de vecteurs Sindbis ou vaccine exprimant les protéines E1 et E2 tronquées à leurs extrémités C-terminales (au niveau, respectivement, des aa 311 et 661) ont permis de montrer:

- que les deux protéines étaient sécrétées
- que ces deux formes sécrétées étaient retrouvées dans le surnageant, associées sous la forme de complexes.

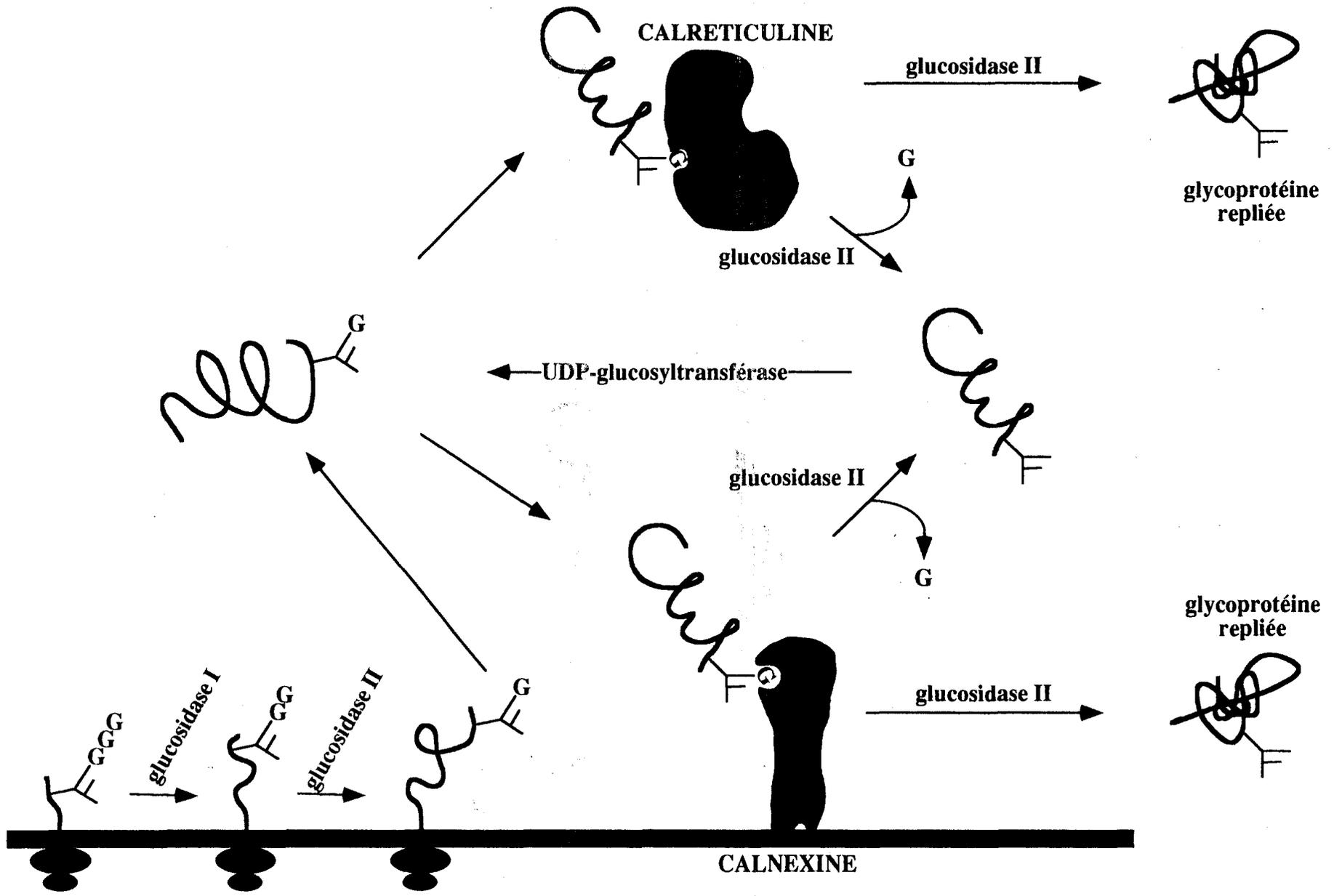


Figure 13 : Processus de glucosylation-déglucosylation dans le réticulum endoplasmique
 (d'après Hammond et Helenius 1995, modifié d'après Spiro et al. 1996)

Cependant, l'utilisation de l'anticorps H2 a permis d'évaluer l'état conformationnel de ces complexes. Les résultats obtenus indiquent que les protéines tronquées et sécrétées sont présentes sous la forme d'agrégats.

Des expériences complémentaires ont été réalisées afin d'évaluer le rôle des extrémités C-terminales des protéines E1 et E2:

- La protéine E2 tronquée (E2t₆₆₁) a été co-exprimée avec E1 entière dans le contexte d'une polyprotéine E1E2. Aucune coprécipitation E1-E2 n'est alors détectée.

- La protéine E1 tronquée (E1t₃₁₁) a été ensuite co-exprimée avec la protéine E2 entière. Une coprécipitation des deux protéines est mise en évidence en utilisant un anticorps anti-E1 non-conformationnel. Néanmoins, en conditions non-réductrices, la majorité des complexes sont retrouvés dans le haut du gel, indiquant qu'il s'agit d'agrégats. Par ailleurs, l'utilisation de l'anticorps H2 ne permet pas de coprécipiter E1. Cette troncation est donc également rédhibitoire pour la formation de l'hétérodimère natif.

L'ensemble de ces résultats indique que les domaines transmembranaires des protéines E1 et E2 sont nécessaires pour la formation et la stabilisation du complexe non-covalent. Neanmoins, ceci n'exclut pas la possibilité que des régions appartenant aux ectodomains des deux protéines puissent également interagir entre elles pour la formation du complexe natif. Ce phénomène semble relativement complexe et des études supplémentaires sont nécessaires pour en préciser les mécanismes.

Récemment, Yi et al. ont tenté d'identifier les séquences impliquées dans les interactions des protéines E1 et E2. Des délétions internes ont été générées dans les deux séquences codant pour ces deux protéines et les produits d'expression ont été analysés par "far-western blotting" et "pull-down" (Yi, et al. 1997). Ces auteurs ont identifié une séquence dans la région N-terminale de E2, située entre les aa 415 et 500, pouvant être responsable d'une interaction avec la protéine E1. Ils ont déterminé plus précisément trois aa qui auraient une importance fondamentale dans cette interaction: le motif « WHY » représenté par les aa 489, 490 et 491. Leur délétion ou leur remplacement interférerait avec la formation du complexe. Cependant, ces résultats ne prennent pas en compte l'état conformationnel des complexes ou des protéines étudiées. Aussi, il est possible que les séquences identifiées soient des domaines d'interaction intervenant dans la formation d'agrégats. Il faut rappeler en effet que 95% des protéines synthétisées sont retrouvées sous la forme d'agrégats.

I.1.4. Interaction des protéines E1 et E2 avec la calnexine

Le repliement correct des protéines peut être aidé par des molécules présentes dans le réticulum endoplasmique. Il s'agit d'une part d'enzymes foldases telles les Protéines Disulfide Isomérase (PDI) et les Peptidyl cis-trans Isomérase (PPI) et d'autre part d'un certain nombre de protéines « chaperons ». Parmi celles-ci, on peut distinguer la grp78 ou BiP (Binding Immunoglobulin Protein) qui est la mieux connue du RE (Hartl, et al. 1994), la calnexine (Bergeron, et al. 1994) et la calréticuline (Wada, et al. 1995).

La calnexine et la calréticuline sont deux chaperons lectiniques, ce qui signifie qu'elles reconnaissent leurs cibles par l'intermédiaire des glycannes (ou oligosaccharides) (Hammond, et al. 1994). La première est ancrée du côté de la lumière du RE alors que la seconde est une protéine luminale libre. Elles s'associent toutes les deux aux glycoprotéines en voie de maturation (Ou, et al. 1993) après l'élimination des deux premiers glucoses du core de l'oligosaccharide par les glucosidases I et II (Herbert, et al. 1995) (pour plus de détails, voir chapitre II). L'intermédiaire protéique monoglucosylé est maintenu par ces deux chaperons dans un cycle de dé- et re-glucosylation jusqu'à ce qu'il ait atteint une structure correctement repliée (Peterson, et al. 1995) (voir figure 13). Les chaperons aident les protéines à atteindre leur état natif en limitant les interactions non-productives pouvant entraîner un repliement erroné. Elles préviennent également la libération de protéines mal ou incomplètement repliées en aidant à les maintenir dans le RE jusqu'à la fin de la maturation: ce phénomène fait partie de ce qu'on appelle le « contrôle de qualité ».

Il a été montré que les protéines E1 et E2, après leur synthèse, s'associent très rapidement à la calnexine et lui reste longtemps associées. De même, l'hétérodimère est retrouvé associé à ce chaperon (Dubuisson and Rice 1996), ce qui suggère que cette molécule participe activement à la formation du complexe E1E2 natif.

L'étude effectuée au laboratoire par Choukhi a permis de mieux comprendre le mécanisme de ce phénomène (Choukhi, et al. 1998). Elle confirme préalablement que E1, E2 et le complexe E1E2 interagissent avec la calnexine. En outre, elle montre que ces mêmes protéines ainsi que leur forme complexée sont retrouvées associées aux protéines chaperons calréticuline et BiP. Mais surtout, elle met en évidence que la nature des complexes coprécipités diffèrent selon les chaperons. Ainsi, la calnexine s'associe préférentiellement aux complexes non-covalents, alors que la calréticuline et BiP s'associe plutôt aux formes agrégataires. Cela indique vraisemblablement que ces chaperons reconnaissent les protéines à des stades différents de leur repliement.

I.1.5. *Notion de Contrôle de Qualité*

Les différentes structures et protéines appartenant au RE (ribosomes, chaperons,...) sont responsables de la synthèse, du repliement, de l'assemblage et de la modification d'un grand nombre de protéines, qu'elles soient solubles ou fixées à la membrane. Aussi, certaines protéines du RE doivent être capables de retenir ou de dégrader les protéines mal ou incomplètement repliées afin de ne libérer que des produits natifs. Ce mécanisme dépendant de la conformation est appelé « contrôle de qualité » (Hammond and Helenius 1995). Ce mécanisme assume un certain nombre de fonctions:

- Il participe à la maturation des protéines nouvellement synthétisées en permettant leur rétention dans le RE jusqu'à ce qu'elles aient atteint un niveau de repliement correct. Cet exemple est illustré par le fonctionnement de la calnexine et de la calréticuline. Elles participent à un cycle, où interviennent également les glucosidases I et II, qui par des étapes successives de glycosylation/déglucosylation vont maintenir une glycoprotéine dans le RE jusqu'à la fin de la maturation (voir figure 13). Nous traiterons plus avant ce sujet dans le troisième chapitre (voir page 61).

- Il permet d'exercer un contrôle post-traductionnel de l'expression des protéines en opérant une rétention dans le RE puis en dirigeant éventuellement celles-ci vers une voie de dégradation. Ainsi, on peut citer l'exemple des lymphocytes B, capables de sécréter des IgG ou des IgE alors que les IgA et les IgM sont retenues et dégradées à l'intérieur de la cellule (Sitia, et al. 1990). Ce contrôle est exercé par le RE.

Les critères par lesquels ce système opère une discrimination entre les protéines, bien ou mal repliées, sont encore mal définis. Il apparaît évident qu'il se réfère probablement, non pas à des séquences spécifiques, mais plutôt à des caractéristiques communes des protéines mal repliées ou en voie de repliement: régions hydrophobes accessibles sur la protéine, groupe sulfhydryle (SH) libre, oligosaccharides partiellement mis en forme, tendance à former des agrégats.

Néanmoins, ce mécanisme exerce probablement une influence capitale sur le comportement des glycoprotéines E1 et E2 du VHC.

I.1.6. Localisation subcellulaire des glycoprotéines du VHC

Un grand nombre de techniques ont été utilisées afin de déterminer cette localisation.

Tout d'abord, l'étude de la résistance ou de la sensibilité à l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H (endo H) des protéines E1 et E2 a été réalisée. L'endo H clive les glycanes maturés dans le RE mais pas les glycanes complexes que l'on peut trouver dans l'appareil de Golgi. Aucune forme résistante à l'Endo H pour les protéines E1 et E2 n'a jamais été détectée (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994). De plus, l'étude des glycanes de E2 et du complexe E1E2, réalisée par Duvet et al., par chromatographie d'affinité et HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance), montre que les oligoglycosaccharides portés par les protéines E1 et E2 sont caractéristique d'une localisation dans le RE (voir page 52)

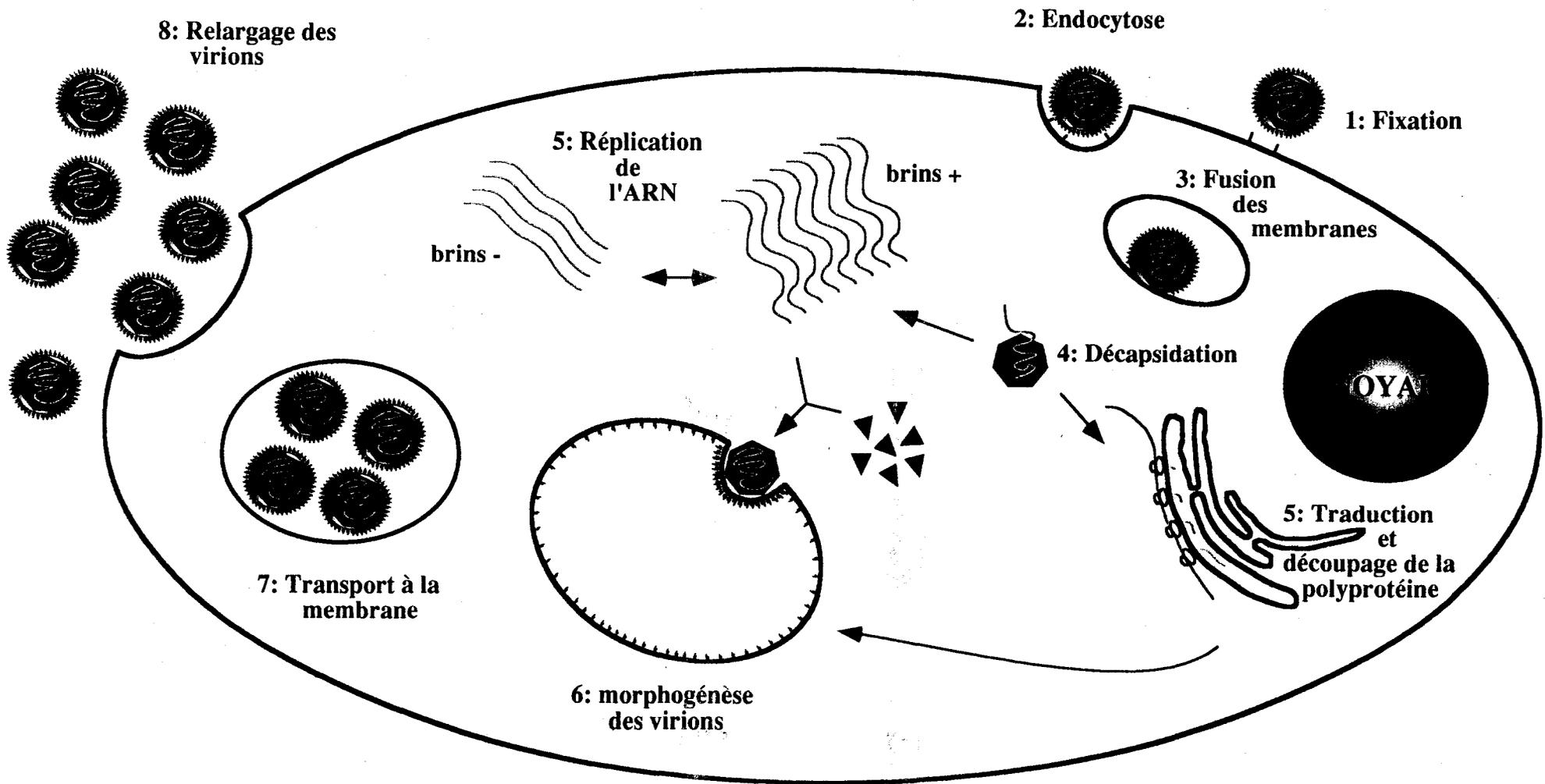
La localisation de ces protéines a également été examinée directement par fractionnement subcellulaire (Dubuisson, et al. 1994). Bien que des problèmes de contamination aient pu être rencontrés, ces expériences ont montré une localisation majeure des protéines dans le RE. Cette information a pu être confirmée par l'utilisation de la microscopie électronique après immunomarquage, que ce soit à l'aide de l'anticorps H2 ou d'autres anticorps dirigés contre les protéines E1 ou E2 (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994).

Enfin, les expériences d'immunofluorescence indirecte montrent que ces glycoprotéines sont colocalisées avec la PDI (voir page 39), une protéine qui n'est présente que dans le RE (Deleersnyder, et al. 1997).

L'ensemble de ces résultats indique clairement que les glycoprotéines, ainsi que les agrégats et le complexe non-covalent E1E2 sont retenus dans le RE. On peut constater également que chez les *Flaviviridae*, l'assemblage des virions enveloppés a lieu par un bourgeonnement à travers les membranes du RE. Les protéines d'enveloppe du virus doivent donc être confinées et accumulées au lieu du bourgeonnement (Pettersson 1991). Par la suite, les vésicules suivent la voie d'exocytose normale de la cellule et relarguent les virus dans le milieu extra-cellulaire par le biais d'une fusion avec la membrane plasmique (voir figure 14) (Rice 1996).

Les processus permettant la rétention des glycoprotéines E1 et E2 et du complexe E1E2 dans le RE sont encore méconnus. Néanmoins, le VHC, comme d'ailleurs tous les virus, utilise

Figure 14 : Cycle infectieux des flavivirus



la machinerie de la cellule qu'il infecte pour se propager. Il est donc vraisemblable que les protéines du VHC utilisent également les mécanismes de localisation des protéines cellulaires.

Les nombreuses études consacrées à ces mécanismes cellulaires permettent d'en définir les principes généraux.

I.1.7. *Les mécanismes de la compartimentalisation des protéines*

Les mécanismes de la compartimentalisation des protéines font partie d'un phénomène plus général consistant à maintenir, dans tous les compartiments de la voie d'exocytose (RE, Golgi,), les protéines nécessaires au fonctionnement de ces organelles. Cela concerne par exemple les chaperons du RE, les enzymes intervenant dans la glycosylation (N-glycosylation et O-glycosylation), la phosphorylation, la palmitoylation mais aussi les molécules impliquées dans le stockage du calcium et la biosynthèse des lipides.

Les protéines E1 et E2 étant retenues au niveau du RE, nous ne détaillerons que les phénomènes concernant cette organelle ou l'appareil de Golgi dans sa partie proximale.

On distingue deux types de mécanismes de localisation en fonction de leur mode de fonctionnement: "récupération" des protéines lorsqu'elles échappent au RE ou rétention stricte des protéines dans les compartiments cibles.

I.1.7.a. Mécanismes de récupération.

Ils sont étroitement dépendants d'une courte séquence présente à l'extrémité (ou aux extrémités) cytoplasmique de la protéine. Sa nature diffère selon qu'on a affaire à une protéine soluble ou à une protéine membranaire.

Les protéines membranaires se distinguent en quatre types (I, II, III, IV) selon leur orientation et leur mode d'insertion dans la membrane. Pour les protéines de type I, le transfert dans le RE se fait grâce à une séquence hydrophobe, située à l'extrémité N-terminale de la protéine, qui est ensuite clivée. L'ancrage est assuré par une seconde séquence hydrophobe présente à l'extrémité C-terminale. Pour les autres types de protéines, une seule séquence hydrophobe assure les deux fonctions (voir figure 15).

→ Mécanismes dépendant de la séquence KDEL

Le tétrapeptide KDEL a été identifié à l'extrémité C-terminale d'un grand nombre de protéines solubles du RE (Munro and Pelham 1987). Cette séquence est nécessaire et suffisante pour la localisation de ces protéines dans le RE. Ainsi, lorsqu'on greffe le peptide KDEL à une protéine indicatrice normalement sécrétée, on constate une localisation de cette protéine dans le RE (Pelham 1989). Cependant, cette molécule semble avoir subi des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent avoir eu lieu que dans l'appareil de Golgi. Les protéines portant la séquence KDEL échappent donc au RE, transitent par l'appareil de Golgi pour retourner finalement au RE (Rothman 1981). Ce mécanisme est aujourd'hui bien compris et le récepteur permettant la récupération des protéines dans l'appareil de Golgi a été identifié (Pelham 1990). Il s'agit, dans les cellules de mammifères, d'une protéine transmembranaire de 26 kDa appelée *erd2*. Initialement, ce récepteur se trouve au niveau du cis-Golgi. Lorsqu'il fixe une protéine portant le tétrapeptide, un changement de conformation du complexe va se produire, entraînant un transport rétrograde du complexe de l'appareil de Golgi vers le RE (Lewis and Pelham 1992). La fixation a lieu de manière pH-dépendante, le pH optimum étant environ 5.0. Il a été observé que l'acidité du milieu augmentait tout au long de la voie d'exocytose. Il est donc probable que la fixation et la séparation du récepteur et de la protéine soit régulée par des différences de pH rencontrées. Dans le RE, un pH plus neutre induirait la séparation des complexes. Le récepteur va alors être recyclé vers l'appareil de Golgi. Le mécanisme de ce recyclage n'est pas élucidé, mais un acide aspartique présent dans le septième domaine transmembranaire de *erd2* semble toutefois avoir une importance capitale dans ce phénomène (Townesley, et al. 1993).

Les protéines membranaires de type I, II ou III (voir figure 15) portent également sur leur extrémité cytoplasmique des motifs permettant leur récupération de l'appareil de Golgi vers le RE. Ce sont des séquences dibasiques. On les distingue en deux types: les motifs di-Lysine et les motifs di-Arginine.

→ Mécanismes dépendants du motif di-Lysine (KKXX)

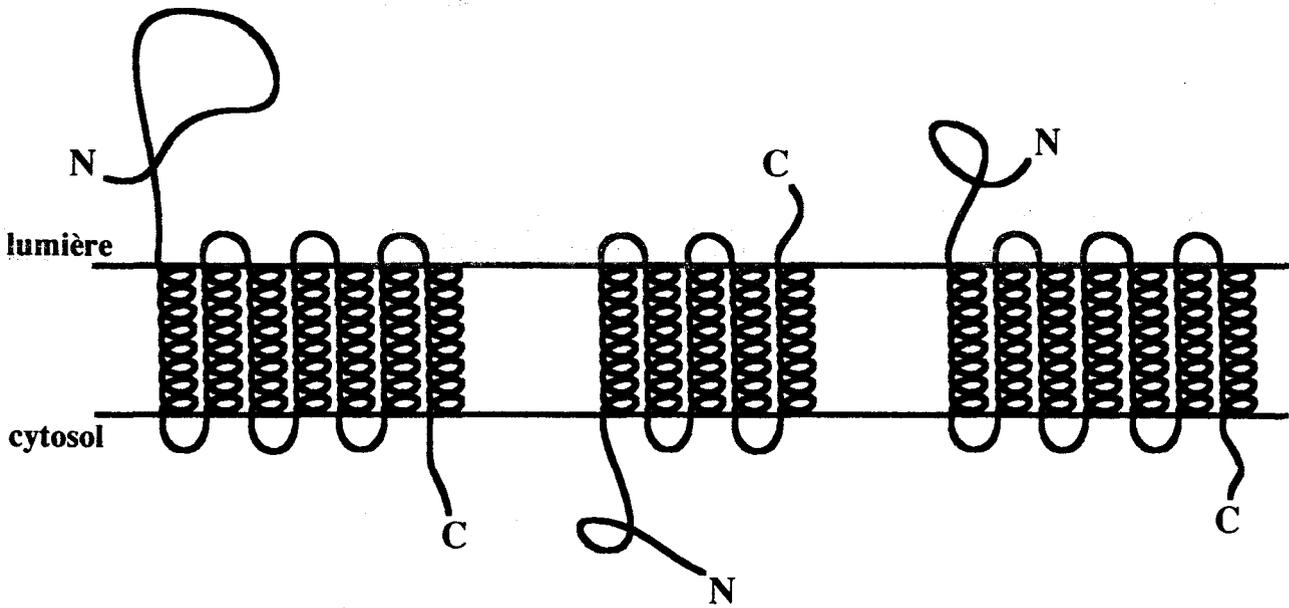
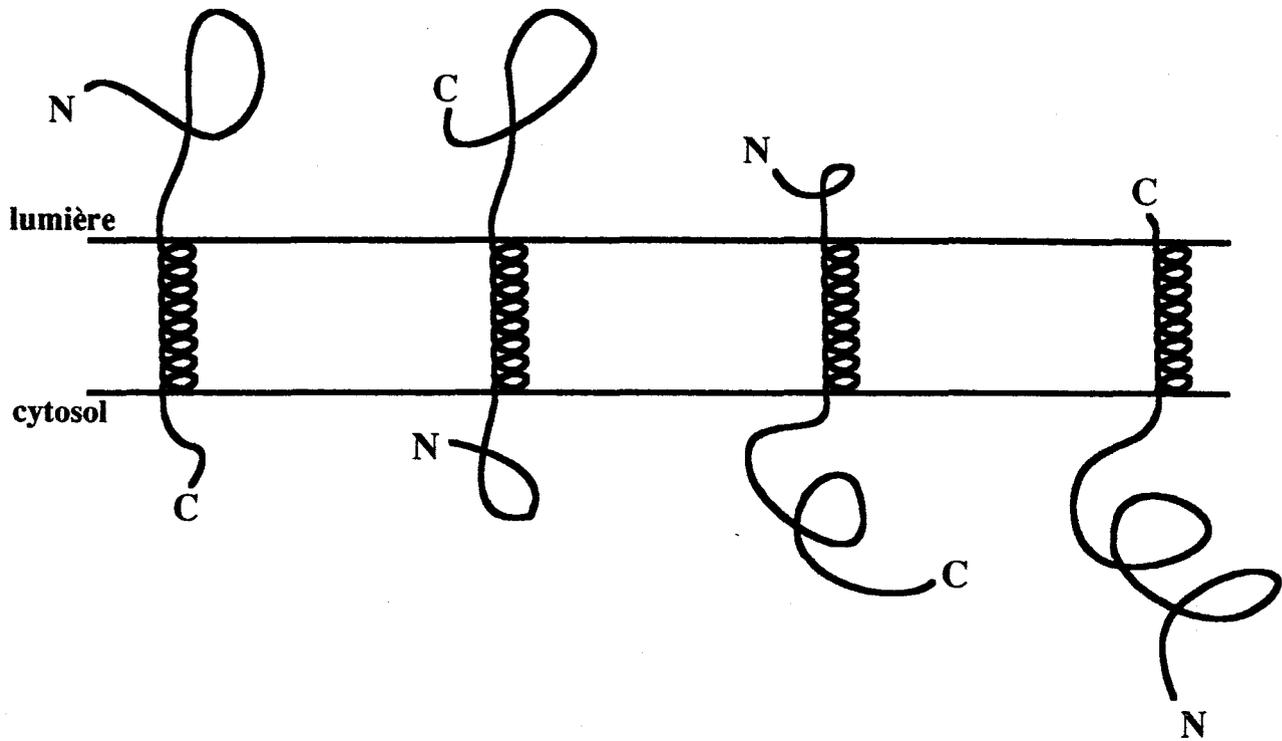
Les protéines membranaires de type I portent un signal constitué de deux lysines, situées en position -3 et -4/-5 par rapport à l'extrémité C-terminale. Ce motif est très conservé

Type I

Type II

Type III

Type IV



Type I

Type II

Type III

Figure 15 : Les différents types de protéines membranaires

parmis les eucaryotes et de façon plus remarquable, entre l'humain et la levure (Gaynor, et al. 1994, Schroder, et al. 1995).

Lorsqu'on introduit des résidus lysine dans une protéine reporter, comme la protéine CD8, normalement transportée à la membrane cellulaire, on note une perturbation plus ou moins importante du transfert de cette protéine à la surface en fonction de la ou des positions des résidus. Une lysine à la position -3 a un effet perturbateur plus important qu'à la position -4 ou -5. Quand deux lysines sont introduites aux positions -3 et -4, ou -3 et -5, la protéine CD8 devient indétectable à la surface cellulaire (Jackson, et al. 1990). Ce motif semble donc nécessaire et suffisant pour une "récupération" d'une protéine par le RE.

Néanmoins, des contre-exemples ont été rapportés. En effet, ERGIC53 est une protéine qui fait partie du compartiment intermédiaire situé entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC). Or, cette protéine porte un motif di-lysine correctement agencé (Schindler, et al. 1993). D'autre part, la suppression du motif di-lysine sur l'enzyme UDP glucuronosyl-transférase (UDP-GT), protéine appartenant au RE, n'entraîne pas une modification de la localisation de la molécule (Jackson, et al. 1993). Il semble donc qu'une information supplémentaire apportée par un autre signal sur la protéine puisse être responsable de sa localisation précise.

De la même façon que pour le motif KDEL, les molécules reporter portant le motif di-lysine subissent des modifications qui ne peuvent avoir lieu que dans l'appareil de Golgi (Jackson, et al. 1993). Il se produit donc un cycle équivalent à celui observé pour les protéines portant le motif KDEL, consistant en une sortie de la molécule du RE vers l'appareil de Golgi puis un transport rétrograde ramenant la protéine vers le RE.

Les mécanismes permettant l'établissement de ce cycle ont été étudiés. Aucun récepteur spécifique pour cette séquence n'a encore été identifié, mais d'autres éléments d'explication ont été mis en évidence. Ainsi, il semble que les microtubules jouent un rôle important dans le transport rétrograde puisqu'il a été montré que le motif di-lysine était responsable de la polymérisation des microtubules *in-vitro* (Dahlloj, et al. 1991). De même, il a été montré que le motif di-lysine fixait spécifiquement le coatomer (Cosson and Letourneur 1994). Le coatomer est une molécule complexe, constituée de sept sous-unités, qui entoure les vésicules de transport de l'appareil de Golgi. Elle porte le nom de COPI. La fixation de la protéine à la molécule COPI est dépendante du GTP (Rothman 1994). Un autre type de molécule, entourant les vésicules de transport a été mis en évidence. Il s'agit de COPII, molécule d'une composition complètement différente de COPI, et constituée de quatre sous-unités (Barlowe, et al. 1994). De nombreuses études ont permis de définir les rôles respectifs de COPI et COPII. COPI serait responsable du transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE (Pelham 1995), alors que COPII serait responsable de l'export des protéines à partir du RE (Aridor, et al. 1995, Guo, et al. 1994).

Pourtant des incertitudes demeurent. Des vésicules contenant COPI bourgeonnant de l'enveloppe nucléaire ont ainsi été identifiées par microscopie électronique après immunomarquage (Bednarek, et al. 1995). On peut s'interroger sur le rôle de telles vésicules.

→ Mécanismes dépendants du motif di-arginine (XXRR)

Les protéines membranaires de type II portent un signal constitué de deux arginines, situées dans les cinq premiers aa par rapport à l'extrémité N-terminale. Ce motif est également nécessaire et suffisant pour la localisation des protéines dans le RE (Nilsson, et al. 1994, Schutze, et al. 1994). Les protéines reporter portant ce signal montrent également des modifications acquises dans l'appareil de Golgi (Jackson, et al. 1993). Le principe général ressemble donc à celui décrit pour le motif di-lysine.

On a vu que l'enzyme UDP-GT était retenue dans le RE, bien qu'on lui ait supprimé sa séquence dibasique KKXX. Des mécanismes de rétention d'une autre nature sont donc impliqués dans ce phénomène. Ce sont des mécanismes de rétention stricte. Il a été postulé que les phénomènes de récupération n'interviendraient que pour corriger une erreur de localisation.

I.1.7.b. Mécanismes de rétention : les domaines transmembranaires

Ces mécanismes font intervenir les domaines transmembranaires des protéines impliquées. Ceci a été mis en évidence pour le récepteur de la lamine B, dont le domaine transmembranaire est suffisant pour une rétention de la protéine dans les membranes de l'enveloppe nucléaire (Smith and Blobel 1993). De même, les expériences réalisées sur les enzymes de glycosylation de l'appareil de Golgi ont montré un phénomène semblable. Ce sont des protéines de type II, ancrées dans la membrane par leur peptide signal. Plusieurs auteurs ont montré que ces domaines transmembranaires ainsi que les régions flanquantes sont suffisantes pour assurer une rétention stricte des protéines dans l'appareil de Golgi. Ainsi, les molécules indicatrices, portant les domaines transmembranaires de ces enzymes, sont bien retenues dans l'appareil de Golgi. Les expériences faisant intervenir la microscopie électronique après immuno-marquage ont apporté la même information : les protéines indicatrices sont bien identifiées dans la citerne prévue (Machamer, et al. 1993, Nilsson, et al. 1993). De plus, les expériences de surexpression indiquent que ce mécanisme ne fait pas intervenir de récepteurs.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer cette rétention stricte.

→ Rétention par oligomérisation des protéines

Cette rétention pourrait avoir lieu en raison de la formation d'oligomère de grande taille, ce qui excluerait leur accès aux vésicules de transport antérograde. Ce phénomène a été mis en évidence pour la protéine E1 du virus IBV (avian coronavirus infectious bronchitis virus). Le premier domaine transmembranaire de la protéine E1 de ce virus entraîne l'oligomérisation et la rétention dans l'appareil de Golgi d'une protéine reporter, ici la protéine G du VSV (vésicular stomatitis virus). Les auteurs montrent que des résidus polaires situés dans ce domaine sont importants pour la rétention et l'oligomérisation (Machamer, et al. 1993). Ce phénomène a également été mis en évidence pour d'autres protéines, comme la NAGT I (N-acetylglucosaminyltransférase I) (Nilsson, et al. 1994), ainsi que les enzymes GalT (β 1,4-galactosyltransférase) et SialylT (α 2,6-sialyltransférase) (Munro 1991, Nilsson, et al. 1991).

→ Rétention dépendant de l'épaisseur des membranes

Massibay et al. ont montré que les régions hydrophobes des domaines transmembranaires des protéines localisées dans l'appareil de Golgi étaient plus courtes que celles correspondant aux protéines de la membrane plasmique (Massibay, et al. 1993). Cette importance de la taille du domaine transmembranaire est également rapporté par Munro (Munro 1991). Ces éléments ont amené Bretscher et Munro à proposer que l'épaisseur de la membrane détermine jusqu'où la protéine va pouvoir transiter (Bretscher and Munro 1993). Ce modèle est à mettre en rapport avec le fait qu'il existe un gradient de concentration en cholestérol à travers l'appareil de Golgi qui semble entraîner un épaissement et une rigidification des membranes le long de ce gradient (Orci, et al. 1981). Aussi, la répartition des protéines se ferait en fonction de la taille de leurs domaines transmembranaires.

Ces deux modèles sont pour l'instant purement spéculatifs et il reste encore à apporter les preuves définitives de la justesse de l'un, de l'autre ou d'une troisième solution intermédiaire.

I.2. Résultats-discussion

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, un certain nombre d'informations étaient disponibles concernant les protéines E1 et E2 lorsque les travaux que nous allons présenter maintenant ont été initiés. Ainsi, les protéines E1 et E2 sont probablement les protéines d'enveloppe du VHC et elle possèdent à leurs extrémités C-terminales des régions hydrophobes leur permettant vraisemblablement de s'ancrer dans la membrane du RE. Ce sont très probablement des protéines de type I (voir figure 15). Ces protéines interagissent pour former un hétérodimère non-covalent sous sa forme native. Les domaines transmembranaires des deux protéines sont probablement impliqués dans cette interaction. E2 semble jouer un rôle de chaperon sur E1. Les protéines E1 et E2 ainsi que le complexe sont retrouvés associés au chaperon calnexine, le complexe se dissociant lentement de celle-ci.

De plus, E1 et E2 ne présentent jamais de glycanes complexes caractéristiques de l'appareil de Golgi. On a pu voir que les protéines E1 et E2 ainsi que le complexe non-covalent sont retenus dans le RE par un mécanisme encore inconnu. Enfin, on ne trouve pas de protéines E1 ou E2 à la surface cellulaire. Il a été suggéré dans un premier temps qu'une interaction prolongée des complexes avec la calnexine pouvait être responsable de cette rétention (Dubuisson and Rice 1996). Pourtant, des données plus récentes ont montré que le complexe E1/E2 natif n'interagit plus avec la calnexine (Deleersnyder, et al. 1997). L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine E1 et/ou la protéine E2 possèdent très probablement un signal (ou des signaux) permettant la rétention de l'hétérodimère non-covalent dans le RE.

Les travaux rapportés dans deux publications que nous allons présenter maintenant ont eu pour objectifs de mettre en évidence les éventuels signaux de rétentions présents sur les protéines E1 et E2. L'identification de ces signaux pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de compartimentalisation des protéines ainsi que le phénomène de bourgeonnement viral du VHC.

ARTICLE n°1

A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localisation maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2

A Retention Signal Necessary and Sufficient for Endoplasmic Reticulum Localization Maps to the Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E2

LAURENCE COCQUEREL, JEAN-CHRISTOPHE MEUNIER, ANDRÉ PILLEZ,
CZESLAW WYCHOWSKI, AND JEAN DUBUISSON*

*Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille et
Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille cédex, France*

Received 8 September 1997/Accepted 4 December 1997

The hepatitis C virus (HCV) genome encodes two envelope glycoproteins (E1 and E2). These glycoproteins interact to form a noncovalent heterodimeric complex which is retained in the endoplasmic reticulum (ER). To identify whether E1 and/or E2 contains an ER-targeting signal potentially involved in ER retention of the E1-E2 complex, these proteins were expressed alone and their intracellular localization was studied. Due to misfolding of E1 in the absence of E2, no conclusion on the localization of its native form could be drawn from the expression of E1 alone. E2 expressed in the absence of E1 was shown to be retained in the ER similarly to E1-E2 complex. Chimeric proteins in which E2 domains were exchanged with corresponding domains of a protein normally transported to the plasma membrane (CD4) were constructed to identify the sequence responsible for its ER retention. The transmembrane domain (TMD) of E2 (C-terminal 29 amino acids) was shown to be sufficient for retention of the ectodomain of CD4 in the ER compartment. Replacement of the E2 TMD by the anchor signal of CD4 or a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) moiety led to its expression on the cell surface. In addition, replacement of the E2 TMD by the anchor signal of CD4 or a GPI moiety abolished the formation of E1-E2 complexes. Together, these results suggest that, besides having a role as a membrane anchor, the TMD of E2 is involved in both complex formation and intracellular localization.

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped virus which belongs to the *Flaviviridae* family (15). Its genome encodes two membrane-associated envelope glycoproteins (E1 and E2). E1 and E2 glycoproteins interact to form a complex which has been proposed as a functional subunit of HCV virions (11, 17, 26, 41). Characterization of HCV glycoprotein complex formation expressed by using the vaccinia/T7 or Sindbis virus system indicates that a majority of HCV glycoproteins are misfolded (9, 11). Recently, we have produced a monoclonal antibody (MAb) which recognizes properly folded E2 and precipitates native HCV glycoprotein complexes but not misfolded aggregates (9). Properly folded E1 and E2 interact to form a heterodimer stabilized by noncovalent interactions, and the kinetics of association between E1 and E2 indicate that the formation of stable E1-E2 complexes is slow (half-time of association [$t_{1/2}$] \approx 2 h). The folding of E1 and E2 has been studied and indicates that formation of intramolecular disulfide bonds is slow for E1 ($t_{1/2}$ > 1 h) whereas it is rapid for E2 (12). By using human and mouse MAbs, it has been shown that folding of a subdomain(s) of E2 correlates with acquisition of intramolecular disulfide bonds but that complete folding of E2 is slow ($t_{1/2}$ \approx 2 h) (9, 19). In addition, E1 expressed in the absence of E2 does not fold properly, suggesting that E2 plays a chaperone-like role in the folding of E1 (32).

The HCV glycoproteins are heavily modified by N-linked glycosylation and contain hydrophobic domains in their carboxy-terminal regions acting presumably as membrane anchors, giving the proteins a type I membrane topology (43). The E2 glycoprotein extends to residue 746 (position on the

polyprotein), and deletions of at least 31 C-terminal amino acids lead to its secretion (47). This is in accordance with other data proposing that the hydrophobic anchor domain begins at amino acid 718 (33). However, only a shorter secreted form of E2 glycoprotein ending at amino acid 661 appears to be properly folded (32). For E1, a larger deletion (71 amino acids) seems to be necessary for its secretion, but this secreted protein is not properly folded (32).

Due to the lack of an efficient cell culture replication system, HCV particle assembly and release have not been examined directly. However, the lack of complex glycans, the endoplasmic reticulum (ER) localization of expressed HCV glycoproteins (11, 41), and the absence of these proteins on the cell surface (11, 49) suggest that initial virion morphogenesis may occur by budding into intracellular vesicles. More recently, we have confirmed that the mature E1-E2 heterodimer does not leave the ER, suggesting that E1 and/or E2 contains a signal for retention of the heterodimer in this compartment (9).

In this study, we show that E2 glycoprotein expressed alone is retained in the ER similarly to the E1-E2 heterodimer and that a signal for ER retention of E2 resides in its transmembrane domain (TMD) (C-terminal 29 amino acids). The evidence for this retention signal was derived from expression of chimeric proteins in which E2 domains were exchanged with corresponding domains of a protein normally transported to the plasma membrane (CD4).

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The HepG2, HeLa, CV-1, and 143B (thymidine kinase-deficient) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, Md. Cell monolayers were grown in Dulbecco's modified essential medium (Gibco BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum.

Plasmid constructs. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed by a standard method (45). Briefly, DNA sequences of protein domains were introduced into plasmid pTM1 (35) by PCR with appropriate oligonucleotides

* Corresponding author. Mailing address: Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille et Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP447, 59021 Lille cédex, France. Phone: (33) 3 20 87 11 60. Fax: (33) 3 20 87 11 11. E-mail: jdubuis@infobiogen.fr.

and templates. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed in two steps by introducing successively the sequences of domains from two different proteins. A unique restriction site was introduced at the junction between the sequences derived from the two proteins for cloning facility. HCV sequences were amplified from H strain (13) clones. Plasmids pTM1/E2(371-661)-DAF and pTM1/E2(371-717)-DAF express E2 sequences with a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor. These two plasmids contain the signal sequence of E2 and the sequence of the ectodomain of E2 or part of it in fusion with the last 37 amino acids of decay-accelerating factor (DAF). Between these two sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Thr and Arg). Plasmids pTM1/E2(371-661)-CD4(374-435) and pTM1/E2(371-717)-CD4(374-435) contain the signal sequence of E2 and the sequence of the ectodomain of E2 or part of it in fusion with the C-terminal 62 amino acids of CD4. Between these two sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Thr and Arg). Plasmids pTM1/CD4(1-371)-E2(662-746) and pTM1/CD4(1-371)-E2(718-746) contain the signal sequence of CD4 followed by the sequence of its ectodomain in fusion with the C-terminal 85 or 29 amino acids of E2. Between these two sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Gly and Ser). Plasmid pTM1/CD4 contains the sequence of the entire CD4 glycoprotein (amino acids 1 to 435) and its signal sequence. Plasmids containing sequences amplified by PCR were verified by sequencing.

Generation and growth of viruses. Vaccinia virus recombinants were generated by homologous recombination essentially as described previously (24) and plaque purified twice on thymidine kinase-deficient 143B cells under bromodeoxyuridine (50 μ g/ml) selection. Stocks of vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (16), the wild-type vaccinia virus strain, Copenhagen, and its thermosensitive derivative *t87* (10), and vaccinia virus recombinants expressing HCV proteins or chimeric proteins were grown and titrated on CV-1 cell monolayers.

Vaccinia virus recombinants vHCV170-809, vHCV371-809, vHCV371-661, and vHCV1-383 have been described previously (14, 32).

Antibodies. MAbs H53 (anti-E2 [40]) and OKT4 (anti-CD4 [42]) were used in this work. Concentrated MAbs were produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer.

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Cells were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants and metabolically labeled with Tran³⁵S-label (ICN) as previously described (11). Labeled infected cells were then lysed with 0.5% Triton X-100 in 20 mM Tris-Cl (pH 7.5)-150 mM NaCl-2 mM EDTA. Immunoprecipitations were carried out as described previously (12).

Endoglycosidase digestions. Immunoprecipitated proteins were eluted from protein A-Sepharose in 30 μ l of dissociation buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS] and 1% 2-mercaptoethanol) by boiling for 10 min. The protein samples were then divided into two equal portions for digestion with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H; New England Biolabs) or no digestion (control). Digestions were carried out for 1 h at 37°C in the buffer provided by the manufacturer. Digested samples were mixed with an equal volume of 2 \times Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

PI-PLC treatment. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) digestions were performed on HeLa cells infected by the appropriate vaccinia virus recombinants and labeled with [³⁵S]methionine. At 24 h postinfection, infected cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C and resuspended by pipetting. Cells were then incubated with 0.5 U of PI-PLC (Boehringer-Mannheim) per ml in PBS for 1 h at 37°C. Cells and supernatant were harvested and analyzed by immunoprecipitation to detect glycoprotein expression.

Immunofluorescence. Subconfluent HepG2 or CV-1 cells grown on coverslips were infected by the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 1 PFU/cell. At 12 h postinfection, cells were fixed for 10 min with isopropanol or paraformaldehyde (4% in PBS). Cells fixed with paraformaldehyde were permeabilized or not for 30 min at room temperature with Tris-buffered saline containing 0.1% Triton X-100. Cells were stained with anti-E2 MAb H53 (dilution, 1/600) or anti-CD4 MAb OKT4 (dilution, 1/100) followed by rabbit anti-mouse (rhodamine conjugated; DAKO) or donkey anti-mouse (fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated; Jackson) immunoglobulin (dilution, 1/100).

Flow cytometric analysis. For detection of cell surface expression of chimeric proteins, HeLa cells grown in six-well plates were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were washed twice with PBS at 4°C and resuspended by pipetting. Cells infected by recombinants expressing the ectodomain of E2 were stained with anti-E2 MAb H53 (dilution, 1/600) followed by FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (dilution, 1/100; DAKO). Cells infected by recombinants expressing the ectodomain of CD4 were stained with FITC-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2 (dilution, 1/100; Immunotech). Stained cells were fixed in PBS-1% paraformaldehyde for 30 min, resuspended in 1 ml of PBS, and subjected to flow cytometric analysis with an Epics-Profile II (Coulter). For each sample, 10⁴ cells were analyzed.

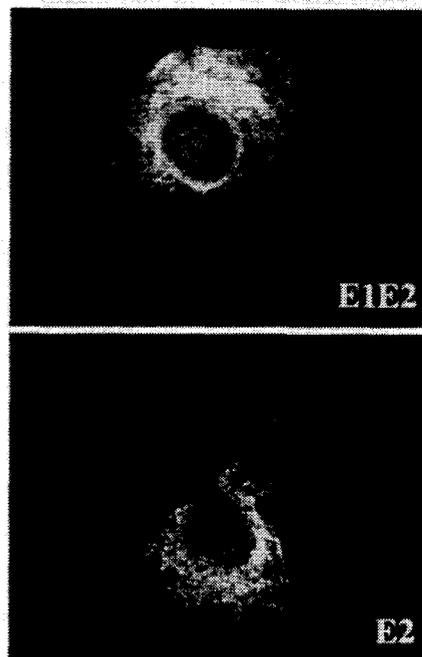


FIG. 1. Localization by indirect immunofluorescence of E2, expressed in the presence or absence of E1. CV-1 cells were coinfecting with vTF7-3 and either vHCV170-809 (E1-E2) or vHCV371-809 (E2) at a multiplicity of infection of 1 PFU/cell. Cells were fixed with isopropanol at 12 h postinfection and immunostained with anti-E2 MAb H53.

RESULTS

Intracellular localization of E2 expressed in the absence of E1. In order to identify the signal(s) involved in ER retention of the native HCV glycoprotein complex, E1 and E2 were expressed alone. Immunofluorescence studies and analysis of its endo H sensitivity indicate that E1 expressed in the absence of E2 does not leave the ER (data not shown). However, we have shown recently that coexpression with E2 is required for the proper folding of E1 (32). Therefore, when E1 is expressed alone, we cannot differentiate an ER localization due to a specific signal from a retention caused by misfolding of the protein (20). Due to this problem and since E2 folds properly in the absence of E1 (32), only the intracellular localization of E2 was studied in this work.

A conformation-sensitive E2-reactive MAb which recognizes the properly folded form of E2 (H53 [40]) was used in this work in order to reduce the background due to the presence of misfolded proteins. In pulse-chase experiments, this MAb precipitates E2 with kinetics similar to what has been observed previously with another MAb (MAb H2 [9]). However, since its relative affinity is higher, MAb H53 instead of H2 was used in this study.

Immunofluorescence studies indicated that the intracellular localization of E2 in the presence of E1 is similar to that in the absence of E1 and that the proteins showed an ER-like distribution of fluorescence (Fig. 1). As another indicator of intracellular trafficking of E2, we also examined the acquisition of endo H resistance. Endo H removes the chitobiose core of high-mannose and some hybrid forms of N-linked sugars but not the complex forms (44). Resistance to digestion with endo H is indicative that glycoproteins have moved from the ER to at least the medial Golgi apparatus and trans-Golgi apparatus, where complex sugars are added. The sensitivity of E2 to digestion with endo H was studied in pulse-chase experiments

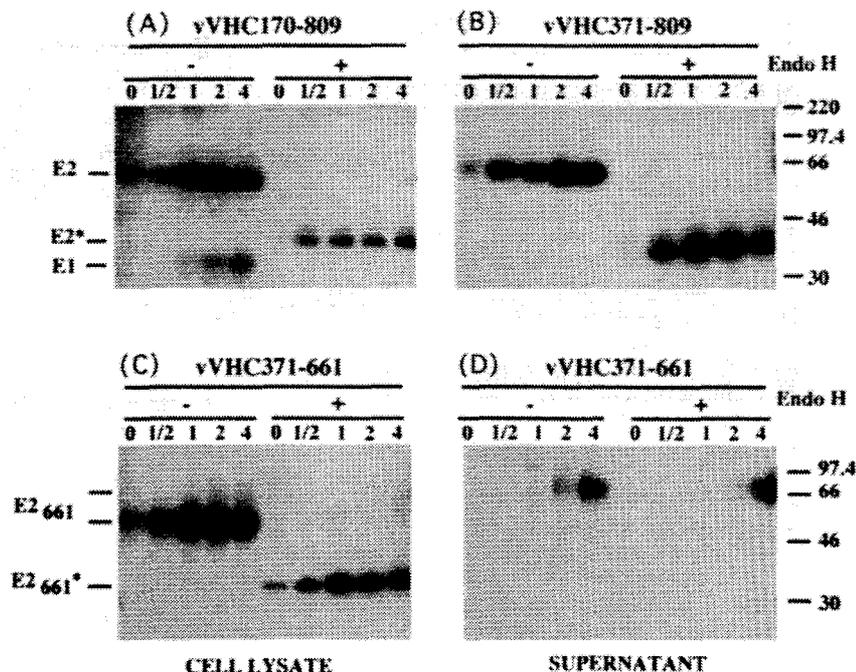


FIG. 2. Sensitivity of E2 to endo H treatment. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing either E1-E2 (vHCV170-809), E2 (vHCV371-809), or a truncated form of E2 (vHCV371-661) at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb H53 and then treated or not with endo H. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by asterisks. The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right. The predicted sequence of E2 contains 11 N-linked potential glycosylation sites.

(Fig. 2). Similar to what was observed for E2 coexpressed with E1 (Fig. 2A), no endo H-resistant form was detected for E2 expressed in the absence of E1 even after 4 h of chase (Fig. 2B). This suggests that E2 expressed in the absence of E1 does not reach the medial Golgi apparatus and trans-Golgi apparatus. To confirm that E2 glycans can be modified by enzymes present in the medial Golgi apparatus or trans-Golgi apparatus, the sensitivity to digestion with endo H was analyzed for a truncated form of E2 which is secreted (32) (Fig. 2 C and D).

Together, these results, similar to what has been previously observed for native E1-E2 complexes (9), strongly suggest that HCV glycoprotein E2 expressed in the absence of E1 is retained in the ER at steady state and does not cycle farther than the cis-Golgi apparatus. This also suggests that an ER retention signal is present in E2.

The TMD of E2 is sufficient to retain, in the ER, the ectodomain of a protein which is normally expressed on the cell surface. The ER localization of E2 (see above) as well as the secretion of a properly folded truncated form of E2 (32) suggests that an ER retention signal is present in the C-terminal 85 amino acids of E2. In order to test this hypothesis, a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 (a protein normally exported to the cell surface) and the C-terminal 85 amino acids of E2 was constructed (CD4-E2₆₆₂ [Fig. 3]). In addition, since secretion of E2 proteins with shorter deletions has also been observed by others (47), a second chimeric protein containing the C-terminal 29 amino acids of E2 in fusion with the ectodomain of CD4 was constructed (CD4-E2₇₁₈ [Fig. 3]). Expression of these chimeric proteins was analyzed in pulse-chase experiments followed by immunoprecipitation with an anti-CD4 MAb (OKT4) and compared with the expression of CD4. As shown in Fig. 4, neither CD4 nor the chimeric proteins showed any modification in their electrophoretic mobility over time. However, the intensity of the

chimeric proteins started to decrease after 2 and 4 h for CD4-E2₆₆₂ and CD4-E2₇₁₈, respectively, whereas it remained constant for CD4, suggesting that the chimeric proteins have a shorter half-life than CD4. This is probably due to degradation. To evaluate whether or not they leave the ER, the sensitivity of these chimeric proteins to digestion by endo H was analyzed in pulse-chase experiments (Fig. 5). The CD4 protein contains two N-linked glycans, and only one of them becomes endo H resistant (48). During the pulse, CD4 was sensitive to endo H treatment, and its resistant form was detected after 1 h of chase or more, whereas the chimeric proteins remained endo H sensitive even after 8 h of chase (Fig. 5). This suggests that CD4-E2₆₆₂ and CD4-E2₇₁₈ do not reach the trans-Golgi apparatus.

Cell surface expression of these proteins was analyzed by immunofluorescence and flow cytometry. Cells expressing CD4, CD4-E2₆₆₂, or CD4-E2₇₁₈ and fixed with paraformaldehyde were all positive as determined by immunofluorescence after permeabilization with Triton X-100, whereas only CD4-expressing cells were detected in the absence of detergent (Fig. 6). The absence of detectable CD4-E2₆₆₂ and CD4-E2₇₁₈ on the surface of cells infected by vaccinia virus recombinants expressing these proteins was confirmed by flow cytometry (Fig. 7).

Together, these data indicate that the TMD of E2 plays a major role in its retention in the ER.

Replacement of the TMD of E2 by the anchor and cytoplasmic domains of CD4 leads to E2 expression on the cell surface. To evaluate the absence of an additional retention signal in the ectodomain of E2, other chimeric proteins containing the ectodomain of E2 ending at amino acid 661 (E2₆₆₁-CD4) or 717 (E2₇₁₇-CD4) in fusion with the C-terminal 62 amino acids of CD4 were constructed (Fig. 3). These chimeric proteins were analyzed as described above with a conformation-sensi-

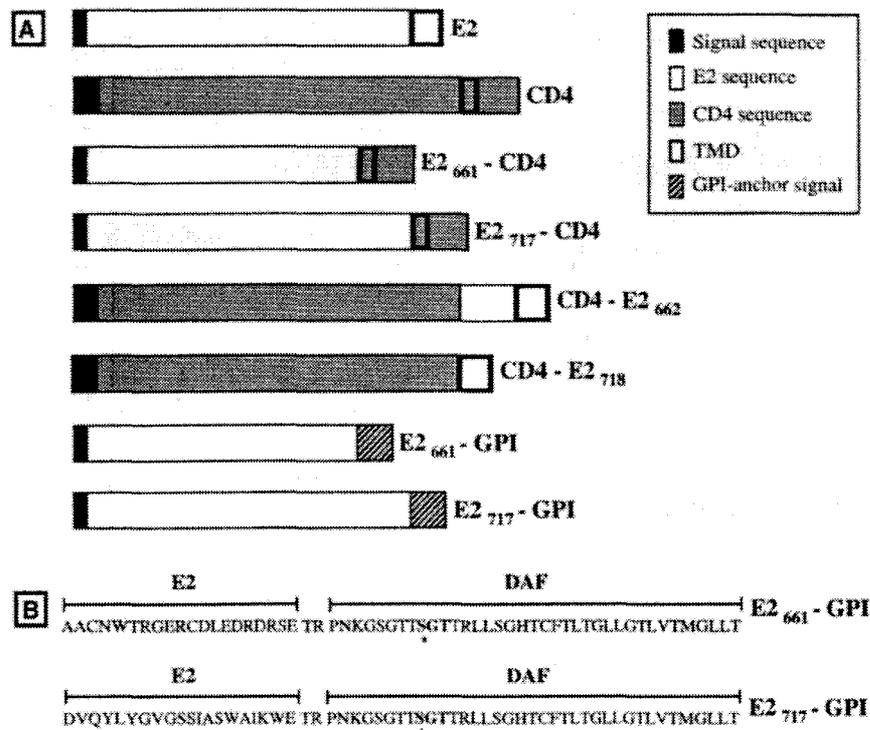


FIG. 3. Schematic representation of the parental proteins E2 and CD4 and chimeric proteins used in this study drawn to scale. E2₆₆₁-CD4, ectodomain of E2, lacking its C-terminal 56 amino acids, fused to the TMD and cytoplasmic domain of CD4; E2₇₁₇-CD4, ectodomain of E2 fused to the TMD and cytoplasmic domain of CD4; CD4-E2₆₆₂, ectodomain of CD4 fused to the C-terminal 85 amino acids of E2; CD4-E2₇₁₈, ectodomain of CD4 fused to the TMD of E2 (C-terminal 29 amino acids); E2₆₆₁-GPI, ectodomain of E2, lacking its C-terminal 56 amino acids, fused to the C-terminal 37 amino acids of DAF; E2₇₁₇-GPI, ectodomain of E2 fused to the C-terminal 37 amino acids of DAF. The ectodomain of E2 is from amino acid 384 to 717 (position on the polyprotein) and the TMD of E2 from amino acid 718 to 746. The ectodomain of CD4 is from amino acid 1 to 373, its TMD is from amino acid 374 to 395, and its cytosolic domain is from amino acid 396 to 435. Details on constructions are reported in Materials and Methods. (B) C-terminal portions of E2₆₆₁-GPI and E2₇₁₇-GPI. The amino acid sequences identify the junction between the E2 ectodomain or its truncated form and the 37-amino-acid GPI anchor addition sequence from DAF. Between these two sequences, there is a sequence of two additional amino acids resulting from cloning. The asterisk below the Ser in the DAF sequence indicates the predicted point of attachment for the GPI anchor (34).

tive MAb (H53) which recognizes an epitope present in the ectodomain of E2. In pulse-chase experiments, two bands were detected after immunoprecipitation of the chimeric proteins (Fig. 8). The glycoprotein E2 and the fast-migrating forms E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4 showed similar molecular masses. The intensity of this band increased during the first 2 and 4 h of chase for E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4, respectively, and then decreased. The slow-migrating band, not detected for E2, appeared after 1 and 2 h for E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4, respectively, and peaked after 4 h of chase before starting to decrease in intensity. The slow migration of this band is probably due to modification of the glycans present in the chimeric proteins. Indeed, it was endo H resistant (Fig. 9), suggesting that E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4 reach at least the medial Golgi apparatus or trans-Golgi apparatus. It has to be noted that the slow-

migrating band had a lower intensity for E2₇₁₇-CD4 (see Discussion).

Cell surface expression of these chimeric proteins was analyzed by immunofluorescence and flow cytometry. Cells expressing E2, E2₆₆₁-CD4, or E2₇₁₇-CD4 and fixed with paraformaldehyde were all positive as determined by immunofluorescence after permeabilization with Triton X-100, whereas only E2₆₆₁-CD4- or E2₇₁₇-CD4-expressing cells were detected in the absence of detergent (Fig. 6). Cell surface expression of these chimeric proteins was confirmed by flow cytometry (Fig. 7).

Together, these results indicate that replacement of the TMD of E2 by the anchor and cytoplasmic domains of CD4 leads to E2 expression on the cell surface.

Replacement of the E2 TMD by a GPI moiety leads to expression of E2 on the cell surface. Many cellular proteins are

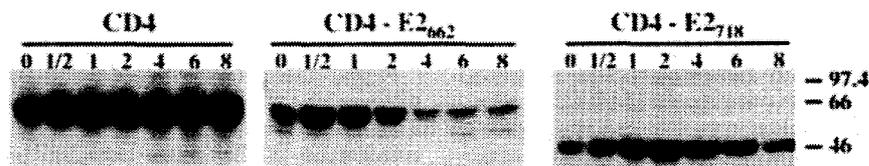


FIG. 4. Expression of CD4, CD4-E2₆₆₂, and CD4-E2₇₁₈ analyzed in pulse-chase experiments. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT4 (anti-CD4). Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

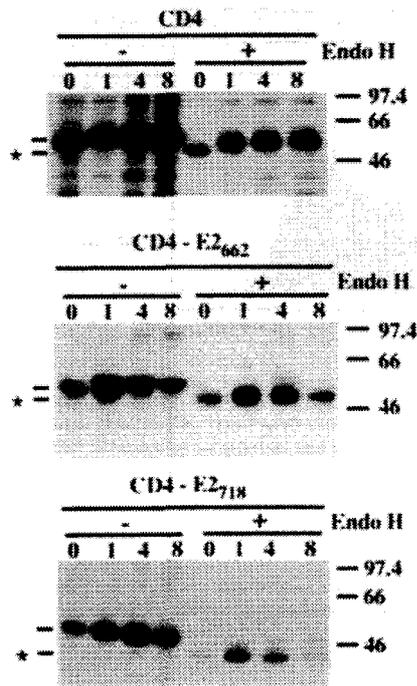


FIG. 5. Sensitivities of CD4-E2₆₆₂ and CD4-E2₇₁₈ to endo H treatment. HepG2 cells were coinfecting with vIF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT4 and then treated or not with endo H. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by asterisks. The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

embedded in membranes via a GPI anchor (8). To evaluate the influence of a GPI anchor on the cellular localization of the ectodomain of E2, chimeric proteins with a signal for a GPI anchor were constructed. Replacement of the normal TMD and cytoplasmic domain of several other type I integral membrane glycoproteins with the C-terminal 37 amino acids of DAF confers GPI anchor addition (7, 23, 25, 27). E2₆₆₁-GPI and E2₇₁₇-GPI were constructed by appending the 37-amino-acid signal of DAF to the ectodomain of E2 (E2₇₁₇-GPI) or a shorter form thereof (E2₆₆₁-GPI) (Fig. 3).

In order to show that a GPI molecule had indeed been added and was responsible for anchoring the ectodomain of E2 in the cell membrane, the sensitivities of these chimeric proteins to PI-PLC digestion were evaluated (Fig. 10). In the absence of PI-PLC treatment E2₆₆₁-GPI and E2₇₁₇-GPI were not detected in the supernatant, whereas after PI-PLC treatment released proteins could be precipitated by our E2-reactive MAb but not in the control expressing E2₆₆₁-CD4. Intracellular expression of the recombinant proteins has been confirmed by immunoprecipitation with the cell lysate as antigen (Fig. 10). These data indicate that E2₆₆₁-GPI and E2₇₁₇-GPI are anchored to the membrane via a GPI moiety and that their ectodomains can be released by digestion with PI-PLC. These two proteins were studied in pulse-chase experiments to test their sensitivities to digestion by endo H and examined by immunofluorescence to analyze their expression on the cell surface. Results were very similar to what was observed for E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4 (data not shown), indicating that the addition of a GPI moiety to the ectodomain of E2 leads to the expression of E2 on the cell surface.

Replacement of the TMD of E2 abolishes the formation of E1-E2 complexes. Results obtained in this work strongly suggest that an ER retention signal is present in the TMD of E2. However, we cannot exclude the presence of another signal in E1 which could participate in ER retention of the native E1-E2 complex. The presence of a potential retention signal has not been studied in this work, since coexpression with E2 is required for the proper folding of E1 (32). As an alternative way to study whether a potential retention signal in E1 could also be involved in retaining the native E1-E2 complex in the ER, E1 was coexpressed with the chimeric forms of E2 produced in this work. However, E1 did not interact with any of these chimeric proteins as shown by immunoprecipitation (Fig. 11), suggesting that the TMD of E2 is involved in HCV glycoprotein interactions, as previously proposed (32, 47).

DISCUSSION

Enveloped viruses acquire their envelopes by budding through one of several host cellular membranes. A large number of enveloped viruses bud through the plasma membrane. Several viruses, however, bud at internal membranes, such as those of the ER (e.g., rotaviruses), the ER-Golgi apparatus

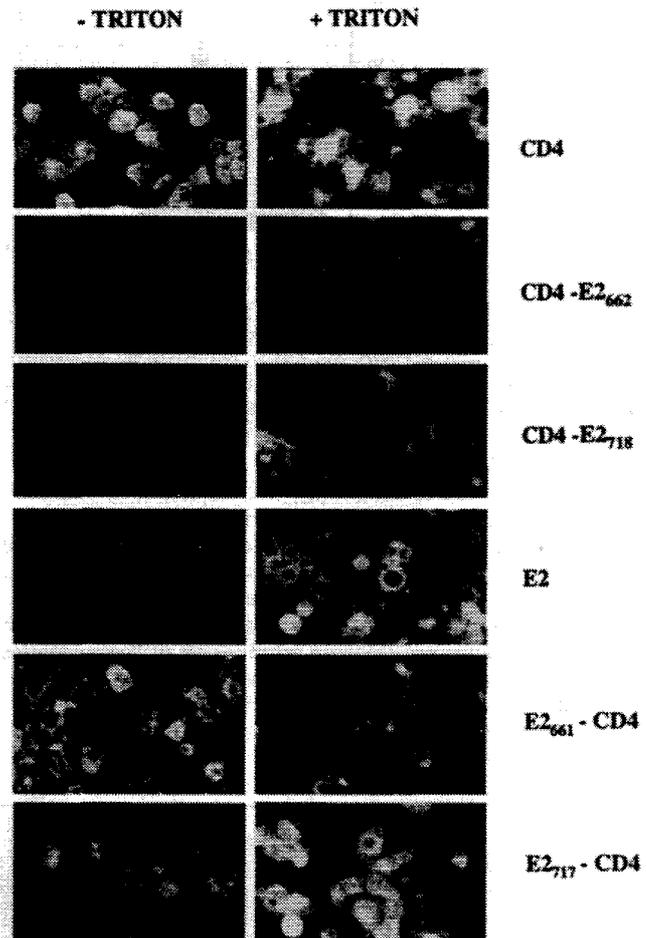


FIG. 6. Cell surface expression of chimeric proteins analyzed by indirect immunofluorescence. HepG2 cells were coinfecting with vIF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 1 PFU/cell. Cells were fixed with paraformaldehyde at 12 h postinfection, permeabilized or not with Triton X-100, and immunostained with anti-E2 (E2, E2₆₆₁-CD4, and E2₇₁₇-CD4) or anti-CD4 (CD4, CD4-E2₆₆₂, and CD4-E2₇₁₈) antibodies.

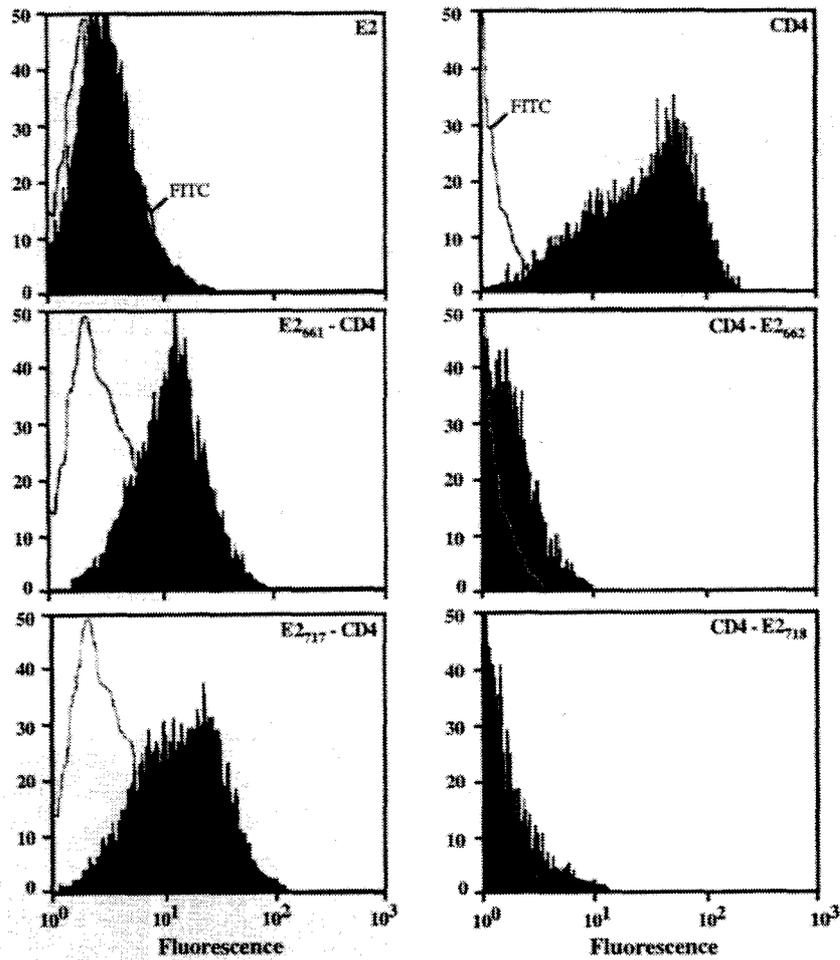


FIG. 7. Cell surface expression of chimeric proteins analyzed by flow cytometry. HeLa cells were coinfectd with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were immunostained with anti-E2 (E2, E2₆₆₁-CD4, and E2₇₁₇-CD4) MAb H53 followed by FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin or with FITC-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2 (CD4, CD4-E2₆₆₂, and CD4-E2₇₁₈). Stained cells were fixed in PBS-1% paraformaldehyde before flow cytometric analysis. The level of cell surface expression is indicated by the shift of the solid histogram (MAb H53 plus FITC conjugate or MAb 13B8.2) to the right from the open control histogram (FITC conjugate alone for E2, E2₆₆₁-CD4, and E2₇₁₇-CD4; MAb 13B8.2 on uninfected cells for CD4, CD4-E2₆₆₂, and CD4-E2₇₁₈).

intermediate compartment (coronaviruses), or the Golgi complex (*Bunyaviridae*) (18, 38). In these cases, virus particles are released from the infected cells either after cell lysis (e.g., rotaviruses) or after transport of virus-containing vesicles to the cell surface (e.g., coronaviruses and bunyaviruses), in which case virus particles are released after fusion of these vesicles with the plasma membrane. For viruses which bud intracellu-

larly, there needs to be an accumulation of the viral membrane glycoproteins, which form the spikes, in the appropriate compartment (38). A strategy that most of these viruses have developed is to endow the spike proteins with signals for compartment-specific targeting and retention, similar to normal compartment-specific cellular proteins (2-4, 21, 29, 30, 50). Based on this observation, ER retention of HCV glycoprotein

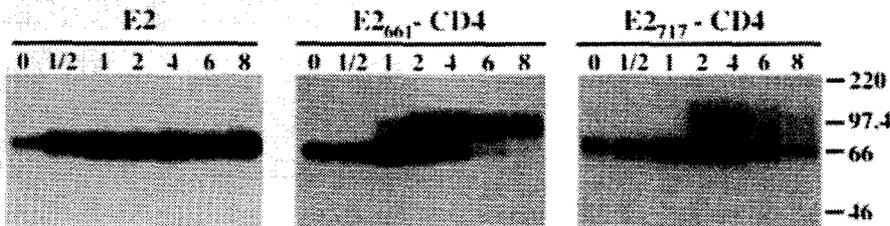


FIG. 8. Expression of E2, E2₆₆₁-CD4, and E2₇₁₇-CD4 analyzed in pulse-chase experiments. HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb H53 (anti-E2). Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

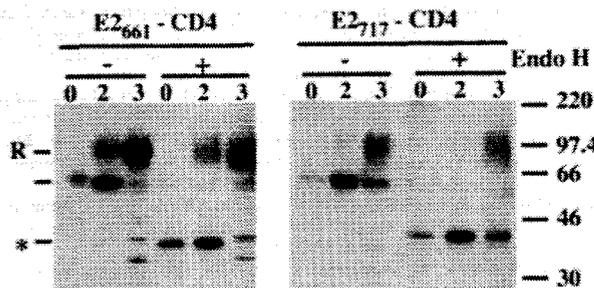


FIG. 9. Sensitivities of E2₆₆₁-CD4 and E2₇₁₇-CD4 to endo H treatment. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb H53 and then treated or not with endo H. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by an asterisk, and endo H-resistant forms are indicated by an "R." The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

complexes suggests that budding of HCV particles could occur in the ER. This hypothesis is reinforced by the observation that flaviviruses acquire their envelopes by budding at internal membranes (probably modified ER) (reviewed in reference 38). The identification of retention signals is therefore important for understanding the mechanisms of virus budding and protein compartmentalization. In this study, we showed that E2 glycoprotein expressed in the absence of E1 is retained in the ER and we have identified a signal for ER retention of E2 in its TMD (C-terminal 29 amino acids).

HCV glycoprotein E2 contains an ER retention signal. The lack of complex glycans, the intracellular distribution of E2 analyzed by immunofluorescence, and the absence of its expression on the cell surface indicate that E2 is present in the ER at steady state and does not cycle farther than the cis-Golgi apparatus. This is similar to what has been observed for the native E1-E2 complex (9). Because of the inefficient folding of HCV glycoproteins (9, 12), retention of E2 in the ER could be due to misfolding. As a general rule, newly synthesized proteins that have acquired a properly folded structure are

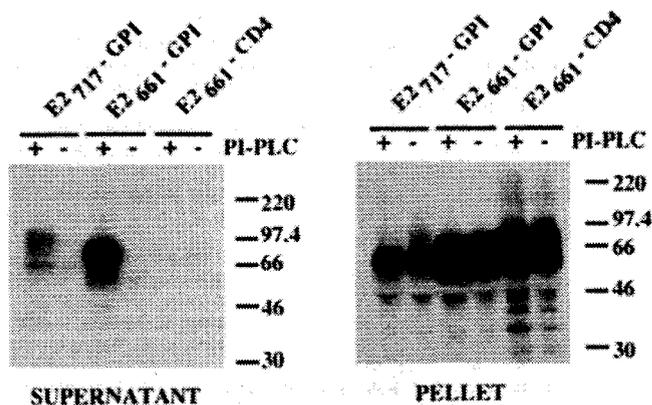


FIG. 10. Sensitivities of E2₆₆₁-GPI and E2₇₁₇-GPI to PI-PLC treatment. HeLa cells coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant were labeled from 4 to 20 h postinfection. Cells were then washed and incubated in PBS in the presence (+) or absence (-) of PI-PLC for 1 h at 37°C. Supernatants and cell pellets were harvested separately and prepared for immunoprecipitation with MAb H53. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

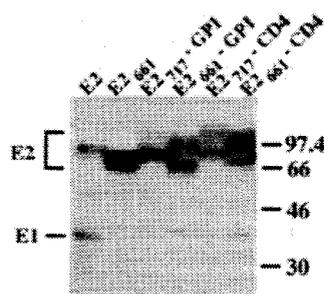


FIG. 11. Effect of E2 TMD replacement on the formation of E1-E2 complexes. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3, vHCV1-383 (expressing E1), and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Infected cells were labeled from 4 to 20 h postinfection. Cell lysates were immunoprecipitated with MAb H53. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). The sizes (in kilodaltons) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

transported from the ER to their final destinations, whereas incompletely folded or misfolded proteins are retained and eventually degraded (20). This conformation-based sorting phenomenon has been called "quality control" (22). However, a conformation-sensitive MAb which recognizes the native form of E2 was used in this work. In addition, recent studies indicate that E2 expressed in the absence of E1 folds properly (32). This suggests that retention of E2 in the ER is not due to the pressure of the quality control but rather to a targeting signal present in E2.

The ER retention signal of E2 maps to its TMD. Replacement of the TMD of E2 with the anchor sequence of CD4 or a GPI moiety was sufficient for its export to the cell surface. In addition, a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 fused to the TMD of E2 was retained in the ER. This indicates that the C-terminal 29 amino acids of E2 contain the information necessary for ER retention. However, the ratio of chimeric E2 proteins leaving the ER was improved when the C-terminal 56 amino acids of the ectodomain of E2 were removed. This suggests that this sequence can reinforce E2 retention in the ER. Alternatively, as recent data obtained by workers in our laboratory suggested (32), the presence of these 56 residues could reduce the efficiency of E2 folding, which, in turn, could lead to less efficient export out of the ER.

HCV glycoprotein E2 is retained in the ER by a targeting signal which does not have the features of a classical ER retention motif. Because the default pathway for the vectorial flow of proteins is supposed to lead from the ER to the plasma membrane (39), mechanisms are necessary to retain resident proteins within intracellular organelles. Several specific signals for the retention and retrieval of ER proteins have been identified. Retrieval from the Golgi complex of soluble ER resident proteins is mediated by recognition of the amino acid sequence KDEL by a specific receptor (37). For transmembrane proteins, intracytoplasmic sequences play a role in ER retention and retrieval. A dilysine motif at the C terminus of type I proteins allows for retrieval from the Golgi complex to the ER in a coat promoter-dependent manner (reviewed in reference 36); a diarginine N-terminal motif may play an analogous role for type II proteins (46), and a tyrosine-based motif has also been shown to function as a cytoplasmic ER retention signal (31). Here we report that the TMD of a type I protein can also be implicated in ER retention, as has been shown for some other proteins (1, 5, 51). Recently, it has been proposed that in the absence of dominant luminal or cytosolic associations, proteins are distributed based on interactions between their

TMDs and the surrounding lipid environment (6, 51). Since cholesterol is known to increase membrane thickness and to decrease deformability, and because its concentration in lipid bilayers increases along the secretory pathway, it has been implicated as being the consequence of lipid-based sorting along the secretory pathway (6, 51). Our data on ER retention of E2 suggest that E2 could fit in this model.

The ER retention signal present in E2 could be sufficient to retain E1-E2 complexes in the ER, but we cannot exclude the presence of another signal in E1. Since coexpression with E2 is required for the proper folding of E1 (32), we cannot discriminate an ER localization of E1 determined by a specific signal from a retention due to misfolding of the protein (20). An alternative approach to solve this problem is to coexpress E1 with E2 in which the retention signal has been deleted. However, the interaction between E1 and E2 is abolished when E1 is coexpressed with E2 in which the TMD has been deleted (32, 47) or when it is coexpressed with chimeric proteins in which the TMD of E2 has been replaced by the anchor signal of CD4 or a GPI moiety (this work). Other approaches will therefore be necessary to analyze the presence of a potential retention signal in E1.

The TMD of HCV glycoprotein E2 is multifunctional. Besides anchoring E2 in the cell membrane and potentially in the HCV envelope (33), the TMD of E2 has other functions. Its C-terminal half is the signal sequence for the p7 polypeptide (28). It plays an important role in the interaction between HCV glycoproteins to form native E1-E2 complexes (references 32 and 47 and this work). Finally, as we show in this work, it is also responsible for the retention of E2 in the ER. This finding reinforces our hypothesis that HCV acquires its envelope by budding through ER membranes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript and Sophana Ung for excellent technical assistance. We are grateful to D. R. Littman and C. M. Rice for the gifts of plasmids containing the sequences for DAF and CD4, respectively.

This work was supported by the following grants: an ATIPE grant from the CNRS, a grant from the ARC (grant 1039), and a grant from the INSERM/AFS (INSERM grant 5FS10).

REFERENCES

- Ahn, K., E. Szczesna-Skorupa, and B. Kemper. 1993. The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**:18726-18733.
- Alconada, A., U. Bauer, and B. Hoffack. 1996. A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network. *EMBO J.* **15**:6096-6110.
- Andersson, A. M., L. Melin, A. Bean, and R. F. Pettersson. 1997. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a *Bunyaviridae* (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J. Virol.* **71**:4717-4727.
- Armstrong, J., and S. Patel. 1991. The Golgi sorting domain of coronavirus E1 protein. *J. Cell Sci.* **98**:567-575.
- Bonifacino, J. S., P. Cosson, N. Shah, and R. D. Klausner. 1991. Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **10**:2783-2793.
- Bretcher, M. S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and Golgi apparatus. *Science* **261**:1280-1281.
- Caras, I., G. Weddell, M. Davitz, V. Nussenzweig, and D. W. Martin. 1987. Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science* **238**:1280-1283.
- Cross, G. A. M. 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:1-39.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* **71**:697-704.
- Drillien, R., D. Spehner, and A. Kirn. 1982. Complementation and genetic linkage between vaccinia virus temperature-sensitive mutants. *Virology* **119**:372-381.
- Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* **68**:6147-6160.
- Dubuisson, J., and C. M. Rice. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**:778-786.
- Feinstone, S., H. J. Alter, H. P. Dienes, Y. Shimizu, H. Popper, D. Blackmore, D. Sly, W. T. London, and R. H. Purcell. 1981. Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *J. Infect. Dis.* **144**:588-598.
- Fournillier-Jacob, A., A. Cahour, N. Escricou, M. Girard, and C. Wychowski. 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **77**:1055-1064.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown (ed.). 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 223. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8122-8126.
- Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* **67**:1385-1395.
- Griffiths, G., and P. Rottier. 1992. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin. Cell Biol.* **3**:367-381.
- Habersecker, F., A. Fournillier, J. Dubuisson, D. Rosa, S. Abrignani, C. Wychowski, I. Nakano, C. Trépo, C. Desgranges, and G. Inchauspé. Unpublished data.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:523-529.
- Hobman, T. C., L. Woodward, and M. G. Farquahr. 1995. Targeting of a heterodimeric membrane complex to the Golgi complex: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Mol. Biol. Cell* **6**:7-20.
- Hurtley, S. M., and A. Helenius. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:277-307.
- Kemble, G. W., Y. I. Henis, and J. M. White. 1993. GPI- and transmembrane-anchored influenza hemagglutinin differ in structure and receptor binding activity. *J. Cell Biol.* **122**:1253-1265.
- Kieny, M.-P., R. Lathe, R. Drillien, D. Spehner, S. Skory, D. Schmitt, T. Wiktor, H. Koprowski, and J.-P. Lecocq. 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**:163-166.
- Kost, T. A., J. A. Kessler, I. R. Patel, J. G. Gray, L. K. Overton, and S. G. Carter. 1991. Human immunodeficiency virus infection and syncytium formation in HeLa cells expressing glycopospholipid-anchored CD4. *J. Virol.* **65**:3276-3283.
- Lanford, R. E., L. Notvall, D. Chavez, R. White, G. Frenzel, C. Simonsen, and J. Kim. 1993. Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* **197**:225-235.
- Lin, A., B. Devaux, A. Green, C. Sagerstrom, J. Elliott, and M. Davis. 1990. Expression of T cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form. *Science* **249**:677-679.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Prági, D. W. McCourt, and C. M. Rice. 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.
- Locker, J. K., J. Klumperman, V. Oorschot, M. C. Horzinek, H. J. Geuze, and P. J. M. Rottier. 1994. The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **269**:28263-28269.
- Machamer, C. E., and J. K. Rose. 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J. Cell Biol.* **105**:1205-1214.
- Mallabiarrena, A., M. A. Jimenez, M. Rico, and B. Alarcon. 1995. A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3- ϵ and adopts a helix-turn structure. *EMBO J.* **14**:2257-2268.
- Michalak, J.-P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.-C. Meunier, S. Ung, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **78**:2299-2306.
- Mizushima, H., M. Hijikata, S.-I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* **68**:6215-6222.
- Moran, P., H. Raab, W. J. Kohr, and I. W. Caras. 1991. Glycophospholipid membrane anchor attachment. *J. Biol. Chem.* **266**:1250-1257.
- Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander, and T. R. Fuerst. 1990. New mammalian expression vectors. *Nature* **348**:91-92.
- Nilsson, T., and G. Warren. 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:517-521.
- Pelham, H. R. B. 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:530-535.
- Pettersson, R. F. 1991. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:67-104.

39. Pfeffer, S. R., and J. E. Rothman. 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 829-852.
40. Pillez, A., and J. Dubuisson. Unpublished results.
41. Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q.-L. Chou. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **67**:6753-6761.
42. Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4061-4065.
43. Rice, C. M. 1996. *Flaviviridae: the viruses and their replication*, p. 931-959. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
44. Robbins, P. W., R. B. Timble, D. F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G. F. Maley, R. Das, B. W. Gibson, N. Royal, and K. Biemann. 1984. Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* **259**:7577-7583.
45. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
46. Schutze, M.-P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**:1696-1705.
47. Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2/NS2 region of HCV. *Virology* **204**:114-122.
48. Shin, J., R. L. Dunbrack, S. Lee, and J. L. Strominger. 1991. Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1918-1922.
49. Spaete, R. R., D. Alexander, M. E. Rugroden, Q.-L. Chou, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, S. Leng, C. Lee, R. Ralston, K. Thudium, J. W. Tung, G. Kuo, and M. Houghton. 1992. Characterization of the hepatitis E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* **188**:819-830.
50. Weisz, O. A., A. M. Swift, and C. E. Machamer. 1993. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **122**:1185-1196.
51. Yang, M., J. Ellenberg, J. S. Bonifacio, and A. M. Weissman. 1997. The transmembrane domain of a carboxy-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **272**:1970-1975.

I.2.1. Etude du signal de rétention de la protéine E2 du VHC

Des expériences préalables d'immunofluorescence indirecte ont été réalisées afin de confirmer la localisation de la protéine E2. Les résultats indiquent que la protéine E2, exprimée seule ou coexprimée avec E1, est localisée dans le RE (figure 1, article 1).

I.2.1.a. Etude de l'expression de protéines indicatrices contenant le domaine transmembranaire de E2

L'importance de la région transmembranaire de E2 a été testée à l'aide d'une protéine chimérique constituée de l'ectodomaine de la protéine CD4 (normalement exportée à la surface) pourvue des 85 aa C-terminaux de la protéine E2 (CD4-E2₆₆₂). Par ailleurs, Selby et al. ont montré qu'une sécrétion de la glycoprotéine E2 était observée en réalisant une délétion plus courte que les 85 aa C-terminaux de E2 (Selby, et al. 1994). Par conséquent, une protéine chimérique constituée de l'ectodomaine de CD4 fusionné avec les 29 aa C-terminaux de E2 (CD4-E2₇₁₈) a également été construite (figure 3, article 1). Ces protéines, ainsi que toutes les constructions que nous décrirons par la suite, sont exprimées à l'aide du vecteur viral vacciné.

Pour déterminer si ces protéines chimériques peuvent quitter le RE, leur sensibilité à la digestion par l'endoH à tout d'abord été testée. En effet, l'ectodomaine de CD4 contient deux glycanes N-liés, et l'un de ces deux glycanes est susceptible de devenir résistant à l'endoH. Les expériences de marquage métabolique suivi de chasse ont montré que:

- La protéine témoin CD4 entière présente une résistance à l'endoH dès d'une heure de chasse.

- Les deux protéines chimériques CD4-E2₆₆₂ et CD4-E2₇₁₈ demeurent sensibles à l'endoH, même après huit heures de chasse (figure 5, article 1).

Cela suggère que ces protéines chimériques ne quittent pas le RE.

La localisation des protéines chimériques a ensuite été étudiée par immunofluorescence indirecte et cytométrie de flux. Pour cela, les cellules ont été infectées par les différents recombinants vaccines et un virus vacciné exprimant la T7 RNA polymérase. Après 12 heures d'infection, les cellules ont été fixées au paraformaldehyde puis selon les cas, traitées ou non au Triton X-100. Comme on peut le remarquer sur la figure 6 (article 1), toutes les cellules

fluorescent après perméabilisation, ce qui témoigne d'une expression normale de toutes les protéines.

En revanche, en absence de perméabilisation par le triton, seul les cellules exprimant la protéine CD4 peuvent être détectées.

Les expériences réalisées en cytométrie de flux ont permis de confirmer que ces protéines recombinantes (CD4-E2₆₆₂ et CD4-E2₇₁₈) ne sont pas détectables à la membrane cellulaire.

I.2.1.b. Etude de l'expression des protéines recombinantes E2 portant l'extrémité C-terminale de CD4

La présence éventuelle d'un second signal de rétention sur la protéine E2 a été recherchée. Pour cela, des protéines chimériques, contenant l'ectodomaine de E2 se terminant aux aa 661 (E2₆₆₁-CD4) et 717 (E2₇₁₇-CD4) fusionné aux 62 aa C-terminaux de CD4, ont été construites. Les produits d'expression ont ensuite été étudiés à l'aide d'un anticorps conformationnel dirigé contre E2, l'anticorps H2.

Les expériences de sensibilité à l'endoH ont montré que les protéines chimériques E2₆₆₁-CD4 et E2₇₁₇-CD4 deviennent résistantes à partir de trois heures de chasse alors que la protéine témoin E2 entière reste sensible (figure 9). L'acquisition d'une résistance à l'endo H de ces protéines recombinantes suggère qu'elles ont atteint au moins le trans Golgi.

La présence de ces protéines à la surface cellulaire a ensuite été testée par immunofluorescence indirecte. Comme on peut le voir figure 6, la fluorescence des cellules non-perméabilisées par le Triton X-100, exprimant les protéines chimériques, témoigne de la présence de celles-ci à la surface. Ces résultats ont également été confirmés par cytofluorimétrie de flux (figure 7).

Ces résultats indiquent que le remplacement du domaine transmembranaire de E2 par l'extrémité C-terminale de CD4, est suffisant pour permettre l'expression de cette protéine en surface. Par conséquent, cela suggère qu'il n'existe pas d'autres signaux de rétention présents sur la protéine E2.

Des études analogues ont également été réalisées en substituant le domaine transmembranaire de E2 par une séquence peptidique constituant un ancrage GPI (glycosyl phosphatidyl inositol. voir détails page 58). L'ancrage GPI permet la fixation de nombreuses protéines cellulaires à la membrane et leur expression à la surface de la cellule (Cross 1990).

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec l'extrémité C-terminale de CD4; le remplacement du domaine transmembranaire de E2 par l'ancrage GPI suffit pour permettre l'expression de la protéine chimérique E2-GPI en surface.

I.2.1.c. Influence des modifications de E2 sur la formation du complexe E1E2.

Afin de mettre en évidence l'influence des modifications de E2 sur la formation des complexes E1E2, les différentes protéines recombinantes ont été coexprimées avec la protéine E1. La coprécipitation de ces protéines a été étudiée par immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps H2. Comme on le voit figure 11 (article 1), aucune coprécipitation de E1 avec E2 n'a pu être observée lorsque le domaine transmembranaire de E2 est absent. Cela suggère donc fortement, comme cela a déjà été proposé (Michalak, et al. 1997, Selby, et al. 1994), que le domaine transmembranaire de E2 serait impliqué dans l'interaction des glycoprotéines E1 et E2.

I.2.1.d. Conclusions

De nombreux éléments indiquaient que la glycoprotéine E2 contenait un signal de rétention dans le RE, des indications telles que: l'absence de glycanes complexes sur la protéine, une distribution intracellulaire et très probablement cytoplasmique comme le suggèrent les expériences réalisées en microscopie électronique et en immunofluorescence, et enfin, une absence d'expression de E2 à la surface. Par ailleurs, comme nous avons pu le voir précédemment, cette rétention n'est pas due à une interaction avec la calnexine. De même, le système de "contrôle de qualité" n'est pas impliqué dans la rétention de cette protéine, car E2 est correctement foldée en l'absence de E1.

Des expériences que nous venons de décrire, nous pouvons déduire que les 29 aa C-terminaux de E2 fusionnés à l'ectodomaine de CD4 suffisent pour retenir cette protéine. A l'inverse, lorsque les 29 aa du domaine transmembranaire de E2 sont remplacés par l'extrémité C-terminale de CD4, on observe une migration de la protéine à la membrane. Les 29 aa C-terminaux de la protéine E2 constituent donc une séquence de rétention pour la protéine E2. L'analyse de la séquence de ces 29 aa montre qu'elle ne contient pas de motif KDEL, ni de motifs dibasiques, tel que cela a pu être décrit pour certaines protéines (voir page 42). Aussi, on peut suggérer que la rétention par le domaine transmembranaire de E2 serait plutôt lié à

l'environnement lipidique. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, un gradient de cholestérol peut entraîner l'épaississement des membranes tout au long de la voie de sécrétion. Il serait donc possible que la taille du domaine transmembranaire de E2 soit un élément déterminant sa compartimentalisation.

Les protéines entières E1 et E2 interagissent pour former un hétérodimère. Or, lorsque le domaine transmembranaire de E2 est absent, cette interaction n'a plus lieu.

Le domaine transmembranaire de E2 est donc multifonctionnel. En effet, Il permet la fixation de la protéine E2 à la membrane du RE, sa moitié C-terminale permet la translocation de la protéine p7 dans le RE, il joue un rôle important dans la formation du complexe natif E1E2 et enfin, il est responsable de la rétention de la protéine E2 dans le RE. Cette rétention de la protéine E2 pourrait être, dans le même temps responsable de la rétention du complexe E1E2.

1.2.2. Informations complémentaires concernant la rétention de E1 et E2

De nombreuses expériences ont été réalisées dans le but de localiser avec précision les protéines E1, E2 et le complexe E1E2. Il a été ainsi montré, par des tests de sensibilité à l'endoH, qu'on ne détectait pas de glycanes complexes sur les protéines, qui témoigneraient d'un passage de la protéine dans l'appareil de Golgi. De même, les expériences d'immunofluorescence indirecte réalisées sur la protéine E2 semblent indiquer qu'elle serait retenue dans le RE. Néanmoins, ces expériences d'immunofluorescence indirecte, si elles permettent de statuer sur une absence de migration de la protéine E2 à la membrane cellulaire, ne donnent aucune précision en ce qui concerne sa localisation intracellulaire en dehors du noyau. De même, la résistance à l'endoH est effective pour des protéines ayant rejoint le Golgi médian. Aussi, cette technique ne permet pas de statuer sur un éventuel passage de la protéine E2 dans le cis-Golgi.

Il restait donc à déterminer avec précision la compartimentalisation du complexe E1E2 et des protéines E1 et E2.

Une étude, réalisée en partie au laboratoire par Duvet et al. (Duvet, et al. 1998), montre clairement le mode de compartimentalisation du complexe E1E2 et de la protéine E2. Rappelons en effet que deux mécanismes de compartimentalisation sont aujourd'hui

communément admis: rétention stricte d'une protéine dans un compartiment ou rétention imparfaite plus recyclage (voir page 42).

En premier lieu, les protéines E1 et E2 ont été coexprimées afin de statuer sur un éventuel passage du complexe E1E2 dans le cis-Golgi. Pour cela, l'auteur a testé la sensibilité à l'endoD (Endo- β -D glucosaminidase D) des protéines de ce complexe. Dans le cis-Golgi, les protéines sont exposées à l'action de l'enzyme α -mannosidase I. L'action de cette enzyme sur les sucres des protéines fait apparaître la forme $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Cette forme est sensible à l'endoD. Or, il est montré que les glycoprotéines restent résistantes à l'endoD, même après quatre heures de chasse. Ceci indique que les glycoprotéines ne parviennent pas jusqu'au cis-Golgi.

Pour mieux caractériser les modifications subies par les glycanes, ceux-ci ont ensuite été séparés des protéines du complexe E1E2 par digestion à la PNGaseF puis analysés par chromatographie d'affinité et HPLC (chromatographie liquide haute performance). La nature des oligosaccharides ainsi mise en évidence, correspond à celle que l'on peut trouver sur des glycoprotéines accumulées dans le RE et qui ne sont pas passées dans le cis-Golgi.

On a vu que le domaine transmembranaire de E2 était un signal de rétention de la protéine dans le RE. Aussi, dans un second temps, E2 a été exprimée seule et les mêmes analyses que celles décrites précédemment ont été réalisées. Elles montrent que la protéine E2 est confinée dans le RE et ne passe pas dans le cis-Golgi. De plus, la protéine recombinante constituée de l'ectodomaine de CD4 et du domaine transmembranaire de E2, a été analysée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont similaires.

Ces résultats montrent donc que les glycoprotéines E1 et E2 sont strictement retenues dans le RE. Ils montrent également que cette rétention peut être entraînée, pour une part au moins, par le domaine transmembranaire de la protéine E2.

Néanmoins, la capacité du domaine transmembranaire de E2 à retenir le complexe E1E2 dans le RE, n'exclut pas que la protéine E1 puisse, elle aussi, posséder un signal de rétention. Aussi, une étude analogue à celle que nous venons de décrire a été réalisée sur la protéine E1.

ARTICLE n°2

The transmembrane domain of the hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum

The Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Is a Signal for Static Retention in the Endoplasmic Reticulum

LAURENCE COCQUEREL,¹ SANDRINE DUVET,^{1,2} JEAN-CHRISTOPHE MEUNIER,¹ ANDRÉ PILLEZ,¹
RENÉ CACAN,² CZESLAW WYCHOWSKI,¹ AND JEAN DUBUISSON^{1*}

CNRS-UMR319, IBL/Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille Cedex,¹ and CNRS-UMR111, Université des
Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex,² France

Received 8 September 1998/Accepted 16 December 1998

Hepatitis C virus (HCV) glycoproteins E1 and E2 assemble to form a noncovalent heterodimer which, in the cell, accumulates in the endoplasmic reticulum (ER). Contrary to what is observed for proteins with a KDEL or a KKXX ER-targeting signal, the ER localization of the HCV glycoprotein complex is due to a static retention in this compartment rather than to its retrieval from the cis-Golgi region. A static retention in the ER is also observed when E2 is expressed in the absence of E1 or for a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 in fusion with the transmembrane domain (TMD) of E2. Although they do not exclude the presence of an intracellular localization signal in E1, these data do suggest that the TMD of E2 is an ER retention signal for HCV glycoprotein complex. In this study chimeric proteins containing the ectodomain of CD4 or CD8 fused to the C-terminal hydrophobic sequence of E1 were shown to be localized in the ER, indicating that the TMD of E1 is also a signal for ER localization. In addition, these chimeric proteins were not processed by Golgi enzymes, indicating that the TMD of E1 is responsible for true retention in the ER, without recycling through the Golgi apparatus. Together, these data suggest that at least two signals (TMDs of E1 and E2) are involved in ER retention of the HCV glycoprotein complex.

Hepatitis C virus (HCV) is a positive-strand RNA virus which belongs to the *Flaviviridae* family (18). Its genome contains a long open reading frame of 9,030 to 9,099 nucleotides that is translated into a single polyprotein of 3,010 to 3,033 amino acids (33). Cleavages of this polyprotein are co- and posttranslational and generate at least 10 polypeptides, including 2 glycoproteins, E1 and E2 (50). These glycoproteins are believed to be type I transmembrane proteins with an N-terminal glycosylated ectodomain and a C-terminal hydrophobic anchor. For E2, C-terminal deletions that remove its hydrophobic region result in secretion of the ectodomain (35, 53). This is in accordance with other data proposing that the hydrophobic anchor domain begins at amino acid 718 (position on the polyprotein) (36). For E1, it has been suggested that a second membrane anchor (between amino acids 262 and 290) might exist in addition to its C-terminal hydrophobic domain (34). However, truncated forms ending at amino acid 311 or 334 and containing this internal sequence can also be secreted (23, 35). E1, like E2, is therefore probably anchored by its C-terminal hydrophobic sequence, but the N-terminal limit of this transmembrane domain (TMD) has not been established.

HCV glycoproteins E1 and E2 interact together to form a noncovalent heterodimer (11, 48). The efficiency of HCV glycoprotein assembly is low, and a large portion of them form heterogeneous disulfide-linked aggregates (13, 14). The noncovalent heterodimeric complex is believed to be the prebudding form of HCV glycoprotein oligomer and accumulates in the endoplasmic reticulum (ER) (11). Recently, the mechanism responsible for HCV glycoprotein complex localization in the ER has been analyzed (15). The absence of modifications

of HCV glycoprotein glycans by Golgi enzymes indicates that the ER localization of these proteins is not due to their retrieval from the cis-Golgi region. Static retention of HCV glycoprotein complexes in the ER suggests that this compartment plays an important role in the acquisition of the envelope of HCV particles.

HCV glycoprotein E2 expressed in the absence of E1 can fold properly (35), and this has allowed us to analyze the intracellular localization of its properly folded form (9, 55). E2 expressed alone is retained in the ER, as shown by the lack of complex glycans, its intracellular distribution, and the absence of its expression on the cell surface. In addition, replacement of the TMD of E2 with the anchor sequence of CD4 has been shown to be sufficient for its export on the cell surface, and a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 fused to the TMD of E2 is retained in the ER (9). This indicates that the TMD of E2 contains the information for its ER localization. This ER localization signal has also been shown to be responsible for true retention of E2 in the ER, without recycling through the Golgi apparatus (15).

The ER retention signal present in E2 could be sufficient to retain E1-E2 complexes in the ER. However, the presence of an ER-targeting signal in E1 as well cannot be excluded. The aim of this study was to look for a potential ER localization signal in E1. By making chimeric proteins containing the ectodomain of CD4 or CD8 fused to the C-terminal hydrophobic sequence of E1, we showed that the TMD of E1 is able to retain these ectodomains in the ER. In addition, these chimeric proteins were not processed by Golgi enzymes. This indicates that the TMD of E1 is responsible for true retention in the ER, without recycling through the Golgi apparatus.

* Corresponding author. Mailing address: Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille & Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP447, 59021 Lille Cedex, France. Phone: (33) 3-20-87-11-60. Fax: (33) 3-20-87-11-11. E-mail: jdubuis@infobiogen.fr.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The HepG2, HeLa, CV-1, and 143B (thymidine kinase-deficient) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville,

Md. Cell monolayers were grown in Dulbecco modified essential medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum.

Plasmid constructs. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed by using the standard methodology (52). Briefly, DNA sequences of protein domains were introduced into pTM1 plasmid (38) by PCR. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed in two steps by introducing successively the sequences of domains from two different proteins. A unique restriction site was introduced between the sequences of the protein domains. HCV sequences were amplified from H-strain clones (17). Plasmids pTM1/CD4(1-371)-E1(347-383), pTM1/CD4(1-371)-E1(353-383), pTM1/CD8(1-159)-E1(347-383) and pTM1/CD8(1-159)-E1(353-383) contain the signal sequence of CD4 or CD8 followed by the sequence of their ectodomain in fusion with the C-terminal 37 or 31 amino acids of E1. Between these sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Gly and Ser). Plasmid pTM1/CD8 contains the sequence of the entire CD8 glycoprotein (amino acids 1 to 214). Plasmids pTM1/E1(171-346)-CD4(374-435) and pTM1/E1(171-352)-CD4(374-435) contain the signal sequence and the ectodomain of E1 in fusion with the C-terminal 62 amino acids of CD4. Between these two sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Leu and Gln). Plasmids containing sequences amplified by PCR were verified by sequencing.

Generation and growth of viruses. Vaccinia virus recombinants were generated by homologous recombination essentially as described earlier (25) and plaque purified twice on 143B cells under bromodeoxyuridine selection (50 μ g/ml). Stocks of vaccinia virus recombinants were grown and titrated on CV-1 monolayers. Vaccinia virus recombinants vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (19), vE1E2p7 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV glycoproteins E1 and E2 and the p7 polypeptide) (17), vCE1 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV proteins C and E1) (35), and vCD4 (a vaccinia virus recombinant expressing full-length CD4) (9) were used in this work.

Antibodies. Monoclonal antibodies (MAbs) A4 (anti-E1 [13]), H53 (anti-E2 [9]), OKT8 (anti-CD8), and OKT4 (anti-CD4) (49) were produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Rabbit antibodies to PDI (SPA-890) and Rab1 were obtained from StressGen (Victoria, British Columbia, Canada) and Zymed (San Francisco, Calif.), respectively. Rabbit polyclonal antibody to mannosidase II (37) was kindly provided by K. Moremen (University of Georgia). The anti-CD4 MAb 13B8.2 was purchased from Immunotech. Rhodamine and cyanogen 2 (Cy2)-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G (IgG) were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pa.).

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Cells expressing HCV proteins were metabolically labeled with 35 S-Protein Labeling Mix (100 μ Ci/ml; DuPont NEN) as previously described (13). Cells were lysed with 0.5% Triton X-100 in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 150 mM NaCl). Immunoprecipitations were carried out as described previously (14). For in vivo labeling of glycan moieties, HepG2 cells were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants and pulse-labeled for 30 min with 100 μ Ci of [3 H]mannose (Amersham) per ml in α minimal essential medium containing 0.5 mM glucose and 10% dialyzed fetal bovine serum. After 4 h of chase, cells were lysed in TBS-0.5% Triton X-100, and the lysates were used for immunoprecipitation.

Endo H digestions. Immunoprecipitated proteins were eluted from protein A-Sepharose in 30 μ l of dissociation buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS] and 1% 2-mercaptoethanol) by boiling for 10 min. The protein samples were then divided into two equal portions for digestion with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H; New England Biolabs) or an undigested control. Digestions were carried out for 1 h at 37°C in the buffer provided by the manufacturer. Digested samples were mixed with an equal volume of 2 \times Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Analysis of oligosaccharide material. Immunoprecipitated [3 H]mannose-labeled proteins were digested overnight at room temperature with 0.2 mg of *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 7.9). Trypsin-treated proteins were boiled for 10 min to inactivate the trypsin, and the peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) containing 50 mM EDTA and 0.2 mg of Na $_3$ per ml in 50% glycerol. The peptides were incubated overnight at 37°C in the presence of PNGase F (0.5 U; New England Biolabs). For some samples, endo H (10 mU) digestion was performed in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5). Size analysis of the glycan moieties was achieved by high-pressure liquid chromatography (HPLC) on an amino-derivatized column ASAHIPAK NH2P-50 (250 by 4.6 mm) (Asahi, Kawasaki-ku, Japan) with a solvent system of acetonitrile-water of from 70:30 to 50:50 (vol/vol) at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. Oligomannosides were identified as previously described (26) by their retention time. Separation of labeled oligosaccharides was monitored by continuous-flow detection of radioactivity with a Flo-One β detector (Packard). The abbreviations used for the sugars are as follows: GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; and Man, mannose.

Affinity chromatography of labeled N glycans. The lectin column (concanavalin A-Sepharose; 5 by 0.5 cm) was equilibrated at room temperature in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 0.1 M NaCl, 1 mM MnCl $_2$, 1 mM CaCl $_2$, and 1 mM MgCl $_2$. Glycan fractions (resulting from PNGase F digestion) were applied to the column which was then eluted with the equilibration buffer

(buffer a). Weakly retained glycans were eluted with 10 mM methyl- α -D-glucoside in the equilibration buffer (buffer b) and strongly retained glycans were eluted with 100 mM α -D-mannoside (buffer c).

Indirect immunofluorescence. Subconfluent HepG2 cells grown on coverslips were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were fixed for 10 min with paraformaldehyde (4% in phosphate-buffered saline [PBS]). Cells were permeabilized or not for 30 min at room temperature with TBS containing 0.1% Triton X-100. Immunofluorescence was carried out as described earlier (11).

Flow-cytometric analysis. For detection of cell surface expression of chimeric proteins, HeLa cells grown in six-well plates were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were washed twice with PBS at 4°C and resuspended by pipetting. Cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2 and fixed in PBS-1% paraformaldehyde for 30 min, resuspended in 1 ml of PBS, and subjected to flow-cytometric analysis with an Epics-Profile II (Coulter). For each sample, 10 4 cells were analyzed.

RESULTS

Design of chimeric proteins to study the presence of a potential intracellular retention signal in E1. In order to identify the presence of a potential intracellular localization signal in E1, chimeras between proteins normally exported to the cell surface (CD4 or CD8) and E1 were constructed (Fig. 1B) and expressed in HepG2 cells with the vaccinia virus/T7 expression system. However, before designing the constructs, we needed a more precise localization of the limits of the domains in E1. Based on experimental data (23, 35), E1 is believed to be anchored by its C-terminal hydrophobic sequence, but the N-terminal limit of this TMD has not been established. The putative N-terminal border of E1 TMD was therefore deduced from the prediction of transmembrane segments by using the TMAP program (45) based on a multiple sequence alignment carried out with the CLUSTAL W1.6 program (56). Based on these analyses, the N-terminal residue of the TMD of E1 was identified as a tryptophane at position 353 (position on the polyprotein) (Fig. 1A). This limit was therefore taken into account to design the chimeric proteins between E1 and CD4 or CD8 (Fig. 1B). For some constructs (CD4-E1 $_{347}$ and CD8-E1 $_{347}$), 6 amino acids of the C terminus of the E1 ectodomain were added to serve as a spacer between the ectodomain of CD4 or CD8 and the predicted TMD of E1.

The TMD of HCV glycoprotein E1 functions as an intracellular localization signal. Recently, we have shown that E1 expressed alone is retained in the ER (9). Replacement of the TMD of E1 by the anchor and cytoplasmic domains of CD4 (E1 $_{352}$ -CD4 and E1 $_{346}$ -CD4) led to ER localization of this protein (data not shown), suggesting that a determinant for ER localization maps in the ectodomain of E1. However, E1 expressed in the absence of E2 does not fold properly (35), and misfolded proteins are usually retained in the ER independently of the presence of a specific retention signal (20). We therefore analyzed the folding of E1 $_{352}$ -CD4 and E1 $_{346}$ -CD4 to see whether these chimeras would be misfolded like E1 expressed alone. Since we have no conformation-sensitive MAb directed against E1, we monitored disulfide bond formation by SDS-PAGE under nonreducing conditions as previously described (14). This method takes advantage of an increase in mobility as a protein acquires a compact conformation stabilized by the formation of intramolecular disulfide bonds. An oxidized form of E1, which appeared slowly, was clearly detected when E2 was coexpressed with E1 (Fig. 2) as previously observed (14). However, SDS-PAGE analysis of E1 $_{346}$ -CD4 (data not shown) and E1 $_{352}$ -CD4 (Fig. 2) under nonreducing conditions did not show any shift of their electrophoretic mobilities, indicating that these proteins are not properly folded. Therefore, when E1 $_{346}$ -CD4 and E1 $_{352}$ -CD4 are expressed

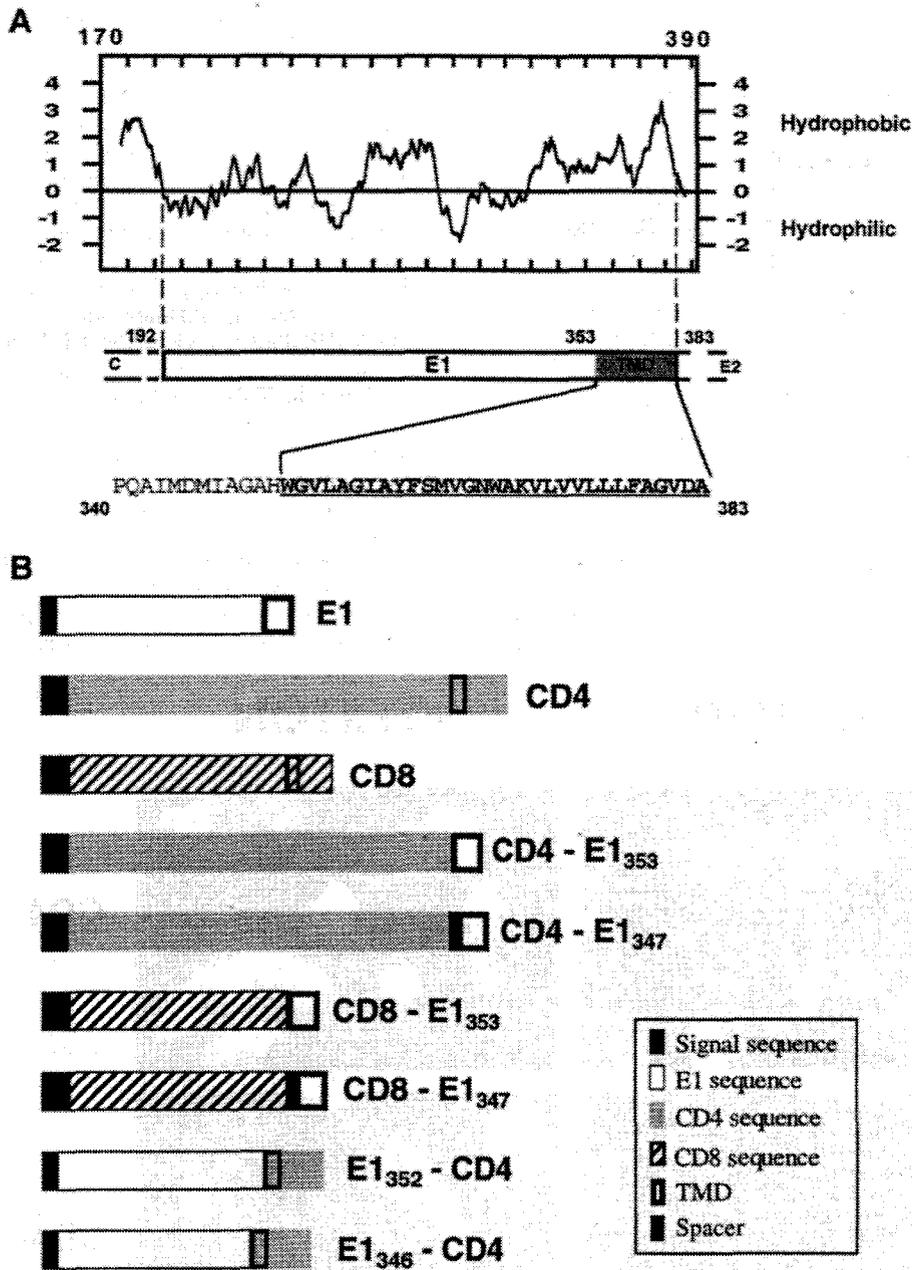


FIG. 1. Schematic representation of the proteins used in this study. (A) Hydropathy plot (28) of HCV glycoprotein E1. The putative ectodomain and TMD of E1 are from amino acids 192 to 352 and amino acids 353 to 383 (position on the polyprotein), respectively. The amino acid sequence of the C-terminal region of E1 is shown, indicated by the single-letter amino acid code. The TMD of E1 is underlined. (B) Schematic representation of the parental (E1, CD4, and CD8) and chimeric proteins. CD4-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₅₃, ectodomains of CD4 and CD8 fused to the TMD of E1; CD4-E1₃₄₇ and CD8-E1₃₄₇, same as CD4-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₅₃ with an additional 6-amino-acid spacer from the ectodomain of E1 at the N terminus of the TMD of E1; E1₃₅₂-CD4, ectodomain of E1 fused to the TMD and cytoplasmic domain of CD4; E1₃₄₆-CD4, same as E1₃₅₂-CD4 with a 6-amino-acid deletion at the C terminus of the ectodomain of E1. The ectodomain of CD4 is from amino acid 1 to 373, its TMD is from 374 to 395, and its cytosolic domain is from 396 to 433. The ectodomain of CD8 is from amino acid 1 to 160, its TMD is from 161 to 187, and its cytosolic domain is from 188 to 214. Details on the constructions are described in Materials and Methods.

alone, we cannot differentiate an ER localization due to a specific signal from a retention caused by misfolding.

Due to the difficulties in analyzing chimeric proteins containing the ectodomain of E1, we focused our work on the potential role of the TMD of E1 in ER retention. Since transmembrane sequences are supposed to fold autonomously as α -helix structures in the lipid environment of the ER membrane (47), chimeric proteins containing the ectodomain of

CD4 in fusion with the TMD of E1 (CD4-E1₃₄₇ and CD4-E1₃₅₃) were produced, and their subcellular localization was studied. Cell surface expression of these proteins was analyzed by immunofluorescence and flow cytometry. Cells infected by a vaccinia virus recombinant expressing full-length CD4 (vCD4) were used as a control of cell surface expression. Cells expressing CD4, CD4-E1₃₄₇, or CD4-E1₃₅₃ and fixed with paraformaldehyde were all positive after permeabilization with Triton

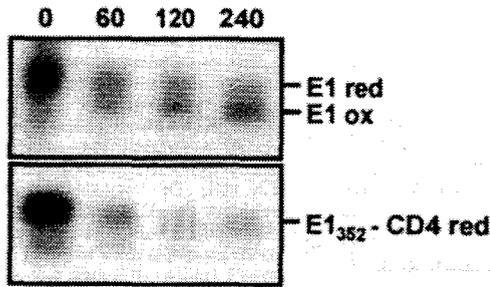


FIG. 2. Analysis of intramolecular disulfide bond formation in E1₃₅₂-CD4. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and a vaccinia virus recombinant expressing E1₃₅₂-CD4 at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Cells coinfecting with vTF7-3 and a vaccinia virus recombinant expressing E1, E2, and p7 were used as a control. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in minutes). Cell lysates were immunoprecipitated with MA6 A4. Immunoprecipitates were analyzed under nonreducing condition by SDS-PAGE (10% acrylamide), red, reduced; ox, oxidized.

X-100, as determined by immunofluorescence, whereas only CD4-expressing cells were detected in the absence of detergent (Fig. 3). The absence of detectable CD4-E1₃₄₇ and CD4-E1₃₅₃ on the surface of cells infected by vaccinia virus recombinants expressing these proteins was confirmed by flow cytometry

(Fig. 4). For this approach, HeLa cells were used instead of HepG2 cells because of their better dissociation capacity. Intracellular retention of CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇ does not seem to be due to misfolding of these chimeric proteins because single mutations of some amino acid residues in the TMD of E1 lead to their cell surface expression (10). Since CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇ showed similar intracellular retention profiles (Fig. 3 and 4 and data not shown), only results obtained with CD4-E1₃₅₃ are presented in the following paragraphs.

Together, these data indicate that the TMD of E1 functions as an intracellular localization signal.

The TMD of E1 is a signal for ER localization. Since CD4-E1₃₅₃ was retained in an intracellular compartment, we suspected that the TMD of E1 plays a role in ER localization. In a first approach to analyze the intracellular localization of CD4-E1₃₅₃, its sensitivity to digestion by endo H was analyzed in pulse-chase experiments (Fig. 5). Endo H removes the chitobiose core of high-mannose and some hybrid forms of N-linked sugars but not the complex forms (51). Resistance to digestion with endo H is indicative that glycoproteins have moved from the ER to at least the medial- or trans-Golgi region, where complex sugars are added. The CD4 protein contains two N-linked glycans, and only one of them becomes

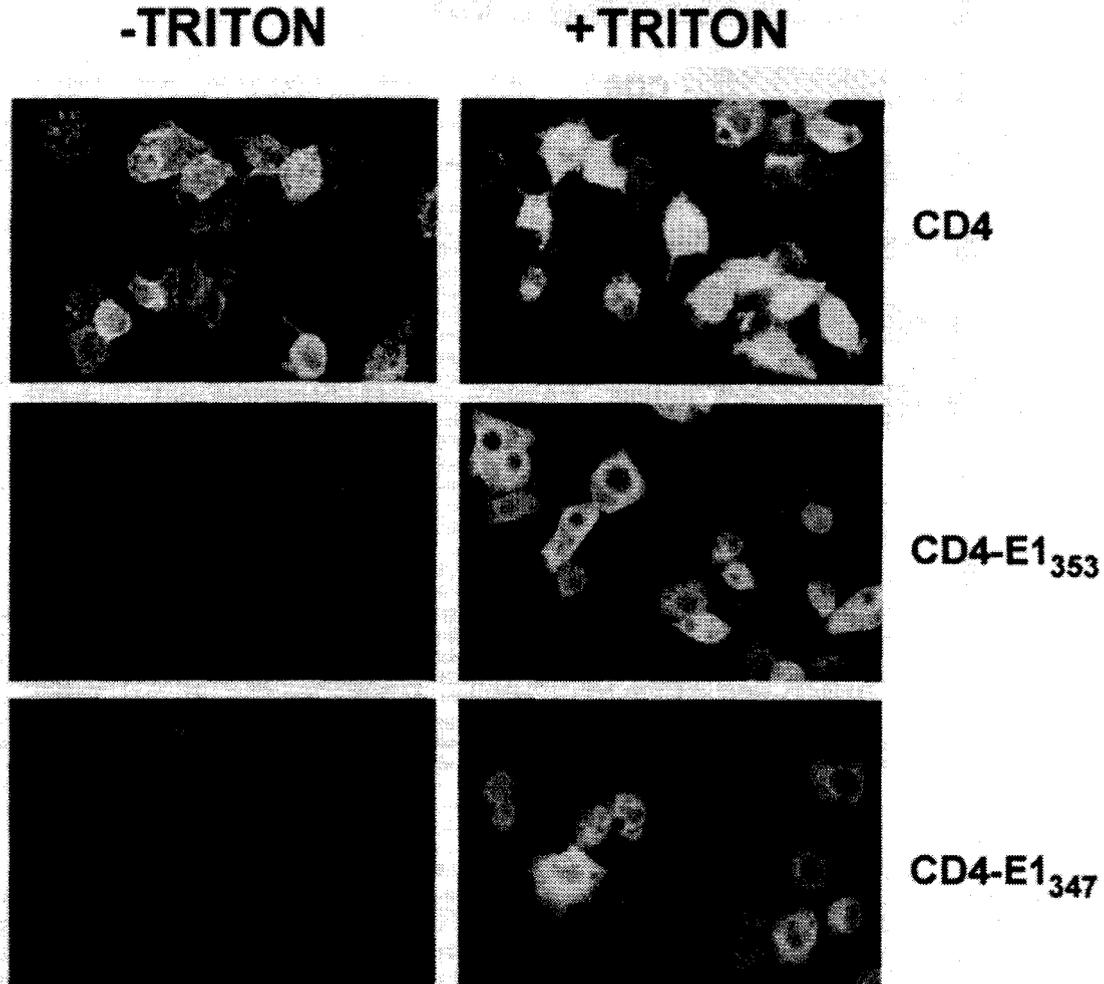


FIG. 3. Absence of cell surface expression of CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were treated for indirect immunofluorescence light microscopy. Cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized or not with Triton X-100, and immunostained with anti-CD4 MAb OKT4 (secondary donkey anti-mouse IgG-Cy2).

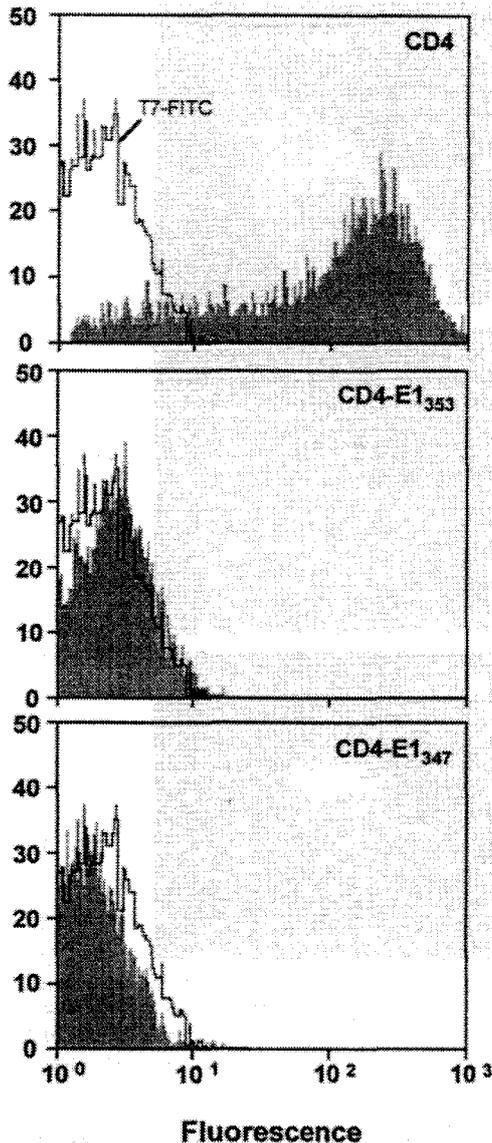


FIG. 4. Expression of chimeric proteins analyzed by flow cytometry. HeLa cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were immunostained with FITC-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2. Stained cells were fixed in PBS-1% paraformaldehyde before flow-cytometric analysis. The level of cell surface expression is indicated by the shift of the solid histogram to the right from the open control histogram (T7-FITC, MAb 13B8.2 on cells infected with vTF7-3 alone).

endo H resistant (54). During the pulse, CD4 was sensitive to endo H treatment, and its resistant form was detected after 1 h of chase or more, whereas the chimeric protein remained endo H sensitive even after 4 h of chase (Fig. 5). This suggests that CD4-E1₃₅₃ does not reach the trans-Golgi region.

To identify the organelle(s) containing CD4-E1₃₅₃, we employed double-label immunofluorescence microscopy with antibodies to known ER, intermediate-compartment, and Golgi antigens. The pattern observed after labeling with MAb OKT4 was similar to that revealed by an antibody against PDI (an ER-resident protein) and different from those shown by antibodies directed against mannosidase II (a marker of the Golgi apparatus) or Rab1 (a marker of the ER-to-Golgi intermediate

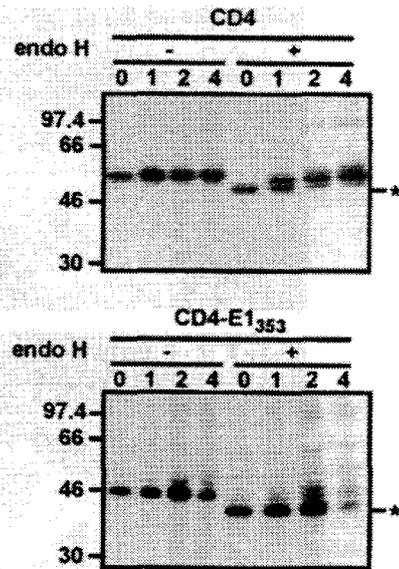


FIG. 5. Sensitivity of CD4-E1₃₅₃ to endo H treatment. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT4 and then treated or not with endo H. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by asterisks. Sizes (in kilodaltons) of protein molecular-mass markers are indicated on the left.

compartment) (Fig. 6). These data indicate that CD4-E1₃₅₃ is localized in the ER at steady state.

The TMD of E1 is a determinant for ER retention and not retrieval. Keeping a protein in a subcellular compartment can be achieved either by a strict retention in this compartment or by retrieval. In the case of HCV glycoproteins, the E1-E2 heterodimer is genuinely retained in the ER without recycling through the Golgi apparatus, and the TMD of E2 has been shown to be responsible for static retention of E2 in the ER (15). Here, we wanted to know whether ER retention by the TMD of E1 would involve a similar mechanism.

As a first approach to answer this question, chimeric proteins between the ectodomain of CD8 and the TMD of E1 were constructed (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇; Fig. 1). The human CD8 protein is a uniquely *O*-glycosylated type I membrane protein (29, 43). Since the initial step of *O*-glycosylation occurs in an early Golgi compartment (44), chimeric proteins containing the ectodomain of CD8 (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇) should be useful tools for analyzing the mechanism of retention mediated by the TMD of E1. If it involves recycling through the Golgi apparatus, addition of *O*-linked GalNAc should occur in the CD8 portion of the chimeric proteins. Molecules containing *O*-glycans should therefore accumulate after several cycles through the cis-Golgi region and back to the ER, and this should be visualized by a shift of the electrophoretic mobility in SDS-PAGE (32, 44). CD8 is synthesized as a 27-kDa species (CD8_u), which is converted to a transient and initially glycosylated 29-kDa form, before the full maturation to a completely glycosylated 32- to 34-kDa doublet (CD8_m). The intermediate form is generated in an early Golgi compartment, and the mature form in the trans-Golgi/trans-Golgi network region. When expressed in HepG2 cells with the vaccinia virus/T7 expression system, the intermediate 29-kDa form was barely detectable (Fig. 7). This is probably due to a faster processing of the glycans in HepG2 cells. Another character-

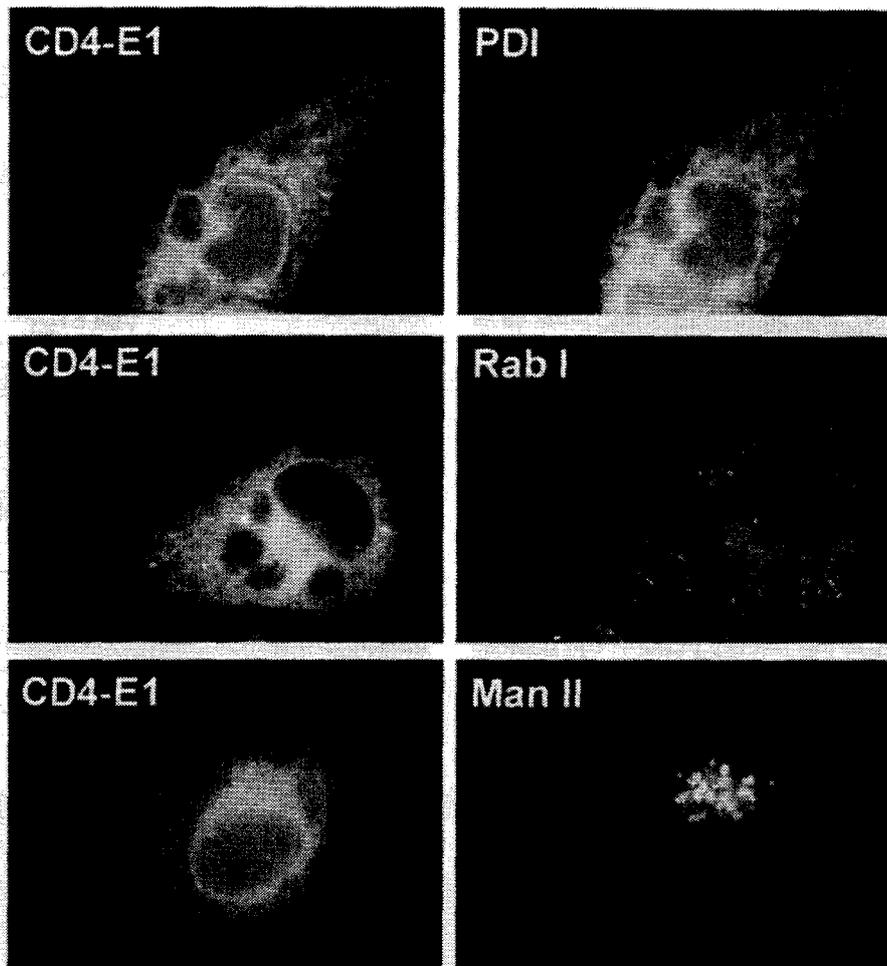


FIG. 6. Indirect double-label immunofluorescence characterization of the organelle containing CD4-E1₃₅₃. Subconfluent HepG2 cells grown on coverslips were infected with vTF7-3 and vCD4-E1₃₅₃ at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and labeled with anti-CD4 MAb OKT4 (secondary donkey anti-mouse IgG-Cy2) and antibodies to PDI, Rab I, or mannosidase II (Man II) (secondary donkey anti-rabbit IgG-rhodamine red-X).

istic of CD8 expression in HepG2 cells is the longer half-life of the 27-kDa precursor (Fig. 7) compared to previously reported data (44). When the transmembrane and cytosolic domains of CD8 were replaced by the TMD of E1 (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇), no shift in the electrophoretic mobility of the molecules was observed in pulse-chase experiments (Fig. 7 and data not

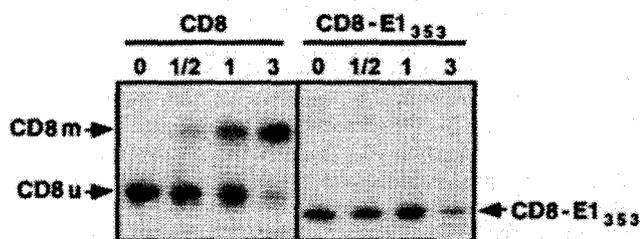


FIG. 7. Expression of CD8 and CD8-E1₃₅₃ analyzed in pulse-chase experiments. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT8 (anti-CD8). Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). CD8u, unglycosylated precursor of CD8; CD8m, mature form of CD8.

shown). The absence of accumulation of an immature *O*-glycosylated form suggests that neither CD8-E1₃₅₃ nor CD8-E1₃₄₇ cycle through the cis-Golgi region. In addition, these data confirm that the TMD of E1 is a signal for ER localization.

As an additional approach to study the mechanism involved in ER localization, we analyzed the modifications that CD4-E1₃₅₃ glycans have potentially acquired in the compartment into which they have transited. As shown above, CD4-E1₃₅₃ is endo H sensitive when analyzed in pulse-chase experiments with chase times of up to 4 h (Fig. 5). The lack of complex-type glycosylation excludes transit through the trans- but not the cis- or medial-Golgi region. In the cis-Golgi region, these proteins would be exposed to Golgi α -mannosidase I, which would process their sugar chains to Man₅GlcNAc₂ (27). Molecules containing Man₅GlcNAc₂ should accumulate after several cycles through the cis-Golgi region and back to the ER. To better characterize their potential processing, CD4-E1₃₅₃ glycans were removed by PNGase F treatment and analyzed by affinity chromatography and HPLC. For this approach, CD4-E1₃₅₃ was labeled with [2-³H]mannose and immunoprecipitated with MAb OKT4 before PNGase F treatment and characterization of labeled glycans. Affinity chromatography analysis of these

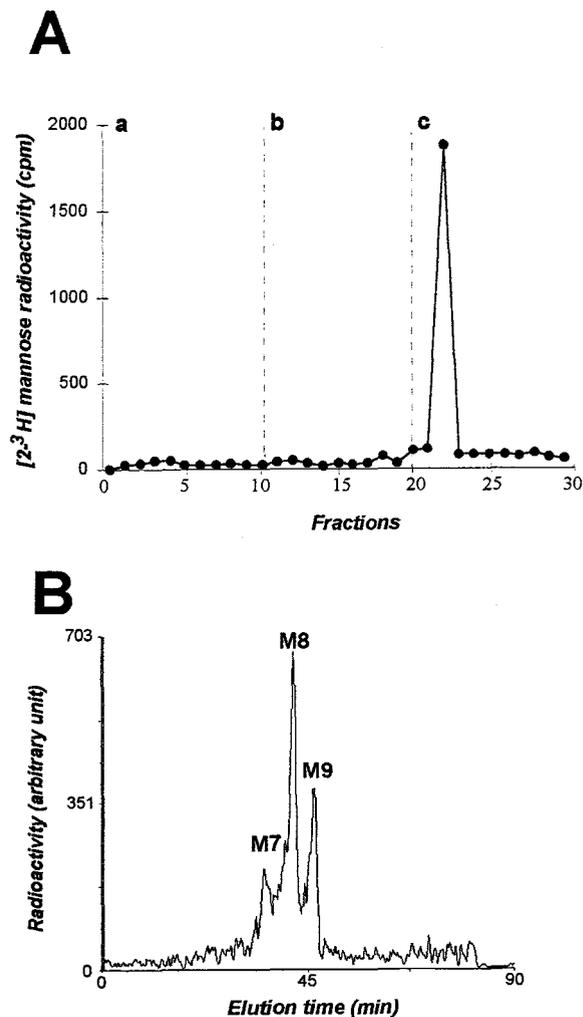


FIG. 8. Analysis of the oligosaccharides bound to CD4-E1₃₅₃. HepG2 cells were coinfecting with vIF7-3 and vCD4-E1₃₅₃. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 30 min with [2-³H]mannose, chased for an additional 4 h, and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with MAb OKT4, and labeled glycans were removed by PNGase F treatment as described in Materials and Methods. Panel A represents concanavalin A-Sepharose chromatography of glycan fractions obtained after PNGase F treatment with the equilibration buffer alone (a), with 10 mM methyl- α -D-glucoside (b), or with 100 mM methyl- α -D-mannoside (c). Panel B shows HPLC analysis of glycans bound to immunoprecipitated glycoproteins after PNGase F treatment. M7, M8, and M9 indicate the oligosaccharide species possessing two GlcNAc residues at their reducing end and 7, 8, or 9 mannose residues, respectively.

glycans showed that 100% of them bound strongly to concanavalin A and eluted in a buffer containing 100 mM α -D-mannoside (buffer c) (Fig. 8A and data not shown), indicating that CD4-E1₃₅₃ oligosaccharide moieties are of the oligomannoside type only. In addition, HPLC analysis of these glycans demonstrated the presence of three species: Man₉, Man₈, and Man₇GlcNAc₂, respectively (Fig. 8B and data not shown). Since the oligosaccharide precursor which is transferred onto nascent proteins is the Glc₃Man₉GlcNAc₂, this reveals the sequential actions of ER glucosidases I and II and at least the action of ER mannosidase yielding Man₈ species. The presence of Man₇ is probably due to the trimming of mannose residues occurring after prolonged residence in the ER (21). Indeed, both Man₉ mannosidase (5) and soluble ER mannosidase (6) have been demonstrated to be able to trim the

mannosidic linkage down to Man₆GlcNAc₂ species. As expected, the affinity chromatography and HPLC profiles of the glycans associated with full-length CD4 revealed the presence of processed species characteristic of the Golgi compartment (data not shown). The nature of the glycans observed in this work confirms the data obtained with CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇ and indicates that CD4-E1₃₅₃ is retained in the ER and cannot reach the Golgi vesicles where additional processing takes place.

DISCUSSION

Due to their limited genetic capacity, viruses exploit basic cellular mechanisms throughout their replicative cycle. For instance, the maturation of viral proteins in infected cells involves mostly host-cell metabolic pathways, including localization mechanisms, folding proteins, and enzymes that modify the primary translation product. For this reason, viral glycoproteins have often been used as tools for cell biology studies. Viral and cellular proteins in the secretory pathway contain some information in their primary structure for determining their subcellular localization. Keeping proteins in a particular compartment can be achieved either by a strict retention in this compartment or by retrieval. Many luminal and type I transmembrane proteins of the ER contain carboxy-terminal sequences of the prototypes KDEL and KKXX, respectively (39, 40). These sequences act as retrieval signals, returning proteins that have left the compartment in which they reside (41). HCV glycoproteins have been shown to localize in the ER at steady state (11), but they do not cycle between the ER and the Golgi apparatus (15). Recently, we have shown that the TMD of E2 is a signal for retention in the ER (9), and in this report we show that the TMD of E1 can play a similar function.

Immunolocalization of chimeric proteins containing the TMD of E1 and analysis of their glycans showed that this TMD is a signal for static retention in the ER. Proteins are transported from the ER to the Golgi complex by carrier vesicles that are formed from the membrane of the ER and that selectively fuse with the cis-Golgi membrane. These vesicles are coated with a set of proteins known as coatomer protein II (COPII) (4). Partitioning of membrane proteins into these vesicles is now believed to be based on a positive sorting signal in the cargo molecules which could interact with the membrane-proximal surfaces of the COPII coat proteins (24). A number of transmembrane proteins that are transported out of the ER contain the motif Asp-X-Glu (where X is any amino acid) in their cytosolic C-terminal domain. Mutational studies of this diacidic motif in the context of the cytoplasmic tail of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G (VSV-G) showed that mutation of either acidic residue to alanine reduced by fivefold the rate of transport of VSV-G from the ER (42). A different motif (paired phenylalanine residues near the C terminus) that also specifies exit from the ER has also been identified in proteins that recycle within the early part of the secretory pathway (12, 16). There is no experimental evidence that HCV glycoproteins contain a cytoplasmic tail or that they possess a positive sorting signal. This could explain some retention of HCV glycoproteins in the ER. However, in the absence of this type of signal, we would expect to detect some slow release of HCV glycoproteins out of the ER, as was observed for mutants of VSV-G deleted of their cytoplasmic tail (42). TMDs have been previously identified as ER localization signals of some proteins (1, 58). For these proteins, it has not been shown whether a mechanism for retrieval or strict retention is involved. Similarly, the transmembrane domain of Golgi proteins and part of their flanking regions contain sufficient information for Golgi retention (41). For these proteins,

subcellular localization is not due to retrieval from other compartments but to strict retention. Although the mechanism by which Golgi retention occurs is still unclear, it has been suggested that membrane thickness could play a role (7). Such a "lipid-based" mechanism could also be responsible for the ER retention mediated by the TMDs of E1 and E2.

HCV glycoprotein complex has at least two signals for ER retention. Recently, we have reported that the TMD of E2 is involved in ER localization (9), and here we show that the TMD of E1 plays a similar role. Enveloped viruses acquire their envelope by budding through one of several host cellular membranes. There needs therefore to be an accumulation of viral membrane glycoproteins, which form the spikes, in the appropriate compartment before budding can take place (46). A strategy that most of these viruses have developed is to endow the spike proteins with signals for compartment-specific localization (2, 3, 22, 30, 31, 57). The TMDs of E1 and/or E2 probably play such a role in retaining HCV glycoprotein complex in the ER where budding is supposed to occur (15). Why has the HCV glycoprotein complex evolved two signals for ER retention? One reason could be that it is necessary to maintain both proteins in the ER before they interact together to form a complex. However, these proteins also interact during their folding (8). In addition, only folded proteins are supposed to leave the ER (20). Alternatively, the fact that both TMDs act as retention signals could be due to the constraints imposed by the other functions played by these domains. Besides their role in ER retention, the TMDs of E1 and E2 also are responsible for the membrane anchor, serve as signal sequences, and are involved in E1-E2 interactions. Mutations in the TMD of one of these glycoproteins, which would suppress its ER localization function, would not probably allow this domain to retain the other functions.

In conclusion, the TMDs of E1 and E2 are both involved in static retention in the ER. As multifunctional domains, these TMDs seem to play a crucial role for HCV envelope formation, and further studies will be needed to decipher their different functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript, F. Penin for help in the sequence analyses of E1, and Sophana Ung for excellent technical assistance. We are grateful to D. R. Littman, B. Moss, and K. Moremen for the gifts of plasmids containing the sequence of CD8, the vaccinia virus recombinant vTF7-3, and the anti-mannosidase II antibody, respectively.

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and grant 9736 from the ARC.

REFERENCES

- Ahn, K., E. Szczesna-Skorupa, and B. Kemper. 1993. The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**:18726-18733.
- Andersson, A. M., L. Melin, A. Bean, and R. F. Pettersson. 1997. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a *Bunyaviridae* (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J. Virol.* **71**:4717-4727.
- Armstrong, J., and S. Patel. 1991. The Golgi sorting domain of coronavirus E1 protein. *J. Cell Sci.* **98**:567-575.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**:895-907.
- Bause, E., W. Breuer, J. Schweden, R. Roeser, and R. Geyer. 1992. Effect of substrate structure on the activity of Man₉-mannosidase from pig liver involved in N-linked oligosaccharide processing. *Eur. J. Biochem.* **208**:451-457.
- Bischoff, J., and R. Kornfeld. 1986. The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various α -mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells. *J. Biol. Chem.* **261**:4758-4765.
- Bretcher, M. S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and Golgi apparatus. *Science* **261**:1280-1281.
- Choukhi, A., S. Ung, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* **72**:3851-3858.
- Cocquerel, L., J.-C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* **72**:2183-2191.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin, and J. Dubuisson. Unpublished data.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* **71**:697-704.
- Dominguez, M., K. Deigaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J. P. Paccard, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, and T. Nilsson. 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* **140**:751-765.
- Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* **68**:6147-6160.
- Dubuisson, J., and C. M. Rice. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**:778-786.
- Duvert, S., L. Cocquerel, A. Pillez, R. Cacan, A. Verbert, D. Moradpour, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J. Biol. Chem.* **273**:32088-32095.
- Fiedler, K., M. Veit, M. A. Starnes, and J. E. Rothman. 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**:1396-1399.
- Fournillier-Jacob, A., A. Cahour, N. Escriou, M. Girard, and C. Wychowski. 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **77**:1055-1064.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2**(Suppl.):223.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8122-8126.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:523-529.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1995. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**:425-433.
- Hobman, T. C., L. Woodward, and M. G. Farquahr. 1995. Targeting of a heterodimeric membrane complex to the Golgi complex: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Mol. Biol. Cell.* **6**:7-20.
- Hussy, P., G. Schmid, J. Mous, and H. Jacobsen. 1996. Purification and in vitro-phospholabeling of secretory envelope proteins E1 and E2 of hepatitis C virus expressed in insect cells. *Virus Res.* **45**:45-57.
- Kaiser, C., and S. Ferro-Novick. 1998. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:477-482.
- Kieny, M.-P., R. Lathe, R. Drillien, D. Spehner, S. Skory, D. Schmitt, T. Wiktor, H. Koprowski, and J.-P. Lecocq. 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**:163-166.
- Kmičick, D., V. Herman, C. J. M. Stroop, J. C. Michalski, A. M. Mir, O. Labiau, A. Verbert, and R. Cacan. 1995. Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₅GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology* **5**:483-494.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631-664.
- Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Littman, D. R., Y. Thomas, P. J. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* **40**:237-246.
- Locker, J. K., J. Klumperman, V. Oorschot, M. C. Horzinek, H. J. Geuze, and P. J. M. Rottier. 1994. The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **269**:28263-28269.
- Machamer, C. E., and J. K. Rose. 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J. Cell Biol.* **105**:1205-1214.
- Martire, G., G. Mottola, M. C. Pascale, N. Malagolini, I. Turrini, F. Serafini-Cessi, M. R. Jackson, and S. Bonatti. 1996. Different fate of a single reporter protein containing KDEL or KKXX targeting signals stably expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**:3541-3547.
- Matsuura, Y., and T. Miyamura. 1993. The molecular biology of hepatitis C virus. *Semin. Virol.* **4**:297-304.

34. Matsuura, Y., T. Suzuki, R. Suzuki, M. Sato, H. Aizaki, I. Saito, and T. Miyamura. 1994. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205:141-150.
35. Michalak, J.-P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.-C. Meunier, S. Ung, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 78:2299-2306.
36. Mizushima, H., M. Hijikata, S.-I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* 68:6215-6222.
37. Moremen, K. W., O. Touster, and P. W. Robbins. 1991. Novel purification of the catalytic domain of Golgi α -mannosidase II: characterization and comparison with the intact enzyme. *J. Biol. Chem.* 266:16876-16885.
38. Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander, and T. R. Fuerst. 1990. New mammalian expression vectors. *Nature* 348:91-92.
39. Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
40. Nilsson, T., M. R. Jackson, and P. A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58:707-718.
41. Nilsson, T., and G. Warren. 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:517-521.
42. Nishimura, N., and W. E. Balch. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277:556-558.
43. Nitsch, L., D. Tramontano, F. S. Ambesi-Impombato, N. Quarto, and S. Bonatti. 1985. Morphological and functional polarity of an epithelial thyroid cell line. *Eur. J. Cell Biol.* 38:57-66.
44. Pascale, M. C., M. C. Erra, N. Malagolini, F. Serafini-Cessi, A. Leone, and S. Bonatti. 1992. Post-translational processing of an *O*-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267:25196-25201.
45. Persson, B., and P. Argos. 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237:182-192.
46. Pettersson, R. F. 1991. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170:67-104.
47. Popot, J.-L. 1993. Integral membrane protein structure: transmembrane α -helices as autonomous folding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:532-540.
48. Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q.-L. Choo. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 67:6753-6761.
49. Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4061-4065.
50. Rice, C. M. 1996. *Flaviviridae*: viruses and their replication. p. 931-959. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
51. Robbins, P. W., R. B. Timble, D. F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G. F. Maley, R. Das, B. W. Gibson, N. Royal, and K. Biemann. 1984. Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* 259:7577-7583.
52. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
53. Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204:114-122.
54. Shin, J., R. L. Dunbrack, S. Lee, and J. L. Strominger. 1991. Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1918-1922.
55. Spaete, R. R., D. Alexander, M. E. Rugroden, Q.-L. Choo, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, S. Leng, C. Lee, R. Ralston, K. Thudium, J. W. Tung, G. Kuo, and M. Houghton. 1992. Characterization of the hepatitis E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* 188:819-830.
56. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
57. Weisz, O. A., A. M. Swift, and C. E. Machamer. 1993. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 122:1185-1196.
58. Yang, M., J. Ellenberg, J. S. Bonifacino, and A. M. Weissman. 1997. The transmembrane domain of a carboxy-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272:1970-1975.

I.2.3. Etude du signal de rétention de la protéine E1 du VHC

Les limites précises du domaine transmembranaire de E1 ont été déduites à partir des études réalisées par plusieurs auteurs (Persson and Argos 1997, Thompson, et al. 1994). Ce domaine transmembranaire est probablement compris entre les aa 353 et 384. Une protéine chimérique constituée de l'ectodomaine de CD4 (CD4-E1₃₅₃) fusionné aux 31 aa C-terminaux de E1 a alors été construite. Une protéine chimérique constituée de l'ectodomaine de CD4 (CD4-E1₃₄₇) fusionné aux 36 aa C-terminaux de E1 a également été réalisée.

Tout d'abord, l'expression à la surface de la cellule de ces protéines recombinantes a été étudiée. Les expériences d'immunofluorescence indirecte ont montré que les cellules exprimant CD4-E1₃₄₇ ou CD4-E1₃₅₃ ne présentaient aucun marquage fluorescent à la surface cellulaire. Cette absence de marquage en surface a été confirmée par cytométrie de flux.

Ces résultats indiquent que le domaine transmembranaire de E1 fusionné à l'ectodomaine de CD4 est suffisant pour entraîner la localisation intracellulaire de cette protéine.

I.2.3.a. Etude de la localisation intracellulaire des protéines CD4-E1₃₄₇ ou CD4-E1₃₅₃

La sensibilité des protéines recombinantes à la digestion par l'endoH a également été testée. Les résultats obtenus indiquent que ces protéines restent sensibles même après quatre heures de chasse. Il semble donc que les protéines ne rejoignent pas le trans-Golgi.

Par ailleurs, des expériences de double marquage en immunofluorescence indirecte ont été réalisées. Elles montrent que les protéines CD4-E1₃₄₇ et CD4-E1₃₅₃ colocalisent avec PDI, une protéine du RE, et pas avec l'enzyme mannosidase II, une protéine de l'appareil de Golgi.

L'ensemble de ces résultats montre que les protéines CD4-E1₃₄₇ et CD4-E1₃₅₃ sont localisées dans le RE. Le domaine transmembranaire de E1 semble se comporter comme un signal de rétention pour le RE.

I.2.3.b. Etude du mode de compartimentalisation des protéines chimériques portant le domaine transmembranaire de E1

Afin d'étudier ce mode de compartimentalisation, des protéines chimériques constituées de l'ectodomaine de CD8 fusionné au domaine transmembranaire de E1 ont également été construites, CD8-E1₃₄₇ et CD8-E1₃₅₃. La protéine CD8 porte une O-glycosylation unique (Littman, et al. 1985). La première étape du phénomène de O-glycosylation a lieu dans les compartiments proximaux de l'appareil de Golgi, c'est à dire le cis-Golgi (Pascale, et al. 1992). La modification de la protéine est alors visible après migration en SDS-PAGE. Cela représente donc un outil particulièrement efficace pour mettre en évidence les compartiments traversés par la protéine. L'étude du comportement des protéines chimériques indique qu'elles n'ont pas subi de modification apparente en électrophorèse. Les protéines ne rejoignent donc pas le cis-Golgi. Ces informations confirment donc que le domaine transmembranaire de E1 est un signal de rétention dans le RE.

Afin de déterminer avec précision le mode de compartimentalisation des protéines chimériques, la même méthode d'analyse décrite en 2 a été utilisée. Les glycanes séparés des protéines par la PGNaseF ont été analysés par chromatographie d'affinité et HPLC. Comme ce qui a été observé pour le domaine transmembranaire de E2, la nature des oligosaccharides ainsi mise en évidence correspond à celle qu'on peut trouver pour des glycoprotéines accumulées dans le RE et qui ne sont pas passées dans le cis-Golgi.

Le domaine transmembranaire de E1 est donc également un signal de rétention stricte dans le RE.

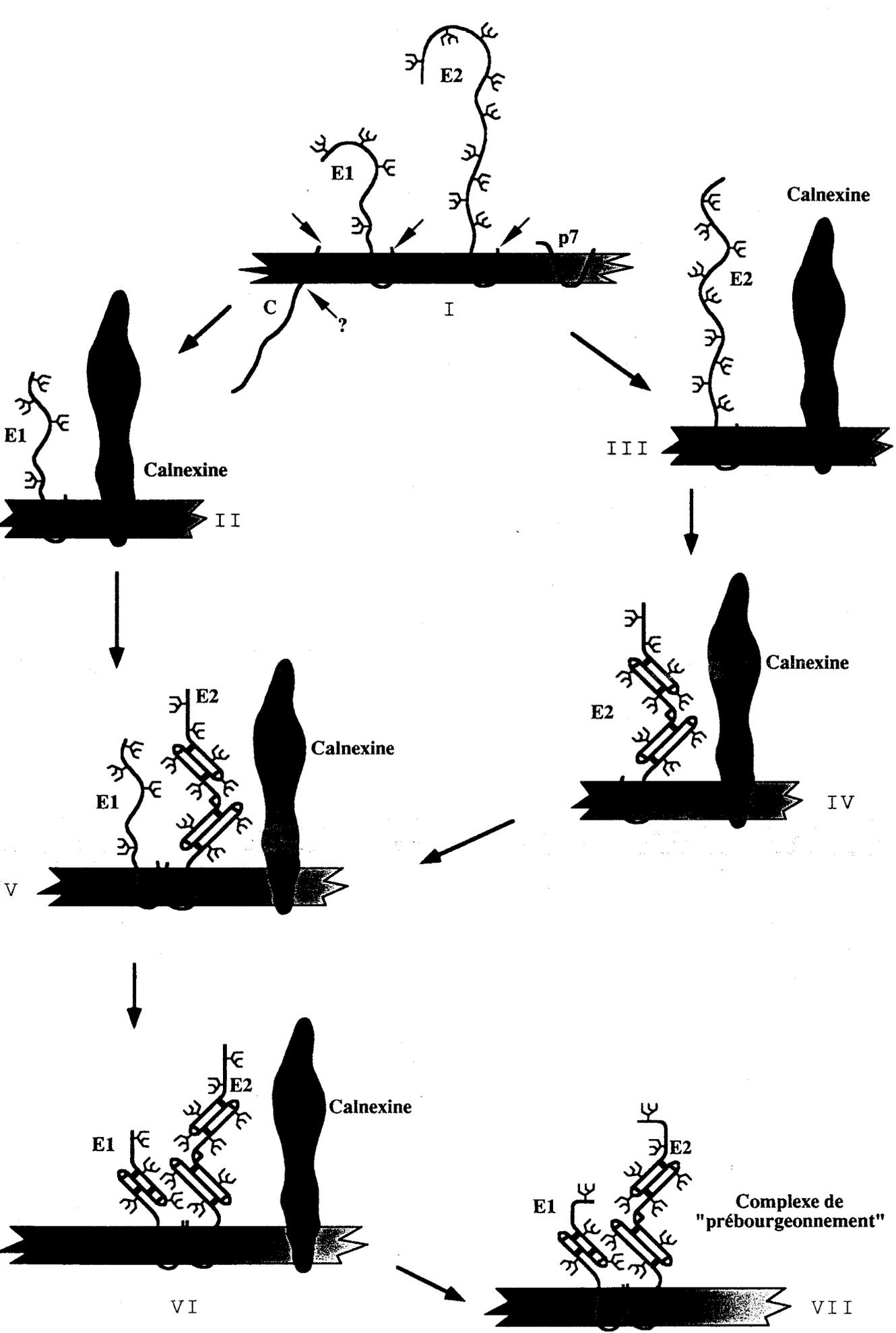
Le domaine transmembranaire de E1, à l'instar de celui de E2, porte donc plusieurs fonctions. Il permet la translocation de E2 dans le RE. Il constitue la zone d'ancrage de la protéine E1 dans la membrane du RE. Il sert de signal de rétention stricte dans le RE de cette protéine.

I.2.4. Conclusion

Le complexe formé par les glycoprotéines E1 et E2 du virus de l'hépatite C comprend donc au moins deux signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique. L'un est porté par la protéine E1, l'autre par la protéine E2, au niveau de leurs domaines transmembranaires respectifs. Comme nous l'avons déjà signalé page 41, ces phénomènes de rétention sont cohérents avec le mécanisme d'assemblage des virions connu pour être celui des *Flaviviridae*. (voir figure 14). En effet, la stratégie adoptée par la plupart de ces virus a été de doter leurs

Figure 16: Modèle putatif du repliement assisté des glycoprotéines E1 et E2 sous la forme d'un complexe non-covalent
(D'après Jean Dubuisson)

Après découpage de la polyprotéine (I), les glycoprotéines E1 et E2 s'associent avec le chaperon du RE, la calnexine (II et III). La protéine E2 va subir un repliement partiel (IV) qui va lui permettre de jouer son rôle de "chaperon-like" vis-à-vis de la protéine E1 (V). La protéine E1 va alors se replier puis le complexe formé par les protéines E1 et E2 va mûrir (VI). Lorsqu'il aura atteint sa forme correctement repliée, le complexe va se dissocier de la calnexine. L'hétérodimère non-covalent ainsi formé correspond probablement au "complexe de prébourgeoisement" (VII).



protéines d'enveloppe de signaux de rétention pour un compartiment spécifique (Andersson, et al. 1997, Armstrong and Patel 1991, Hobman, et al. 1995, Locker, et al. 1994, Machamer and Rose 1987, Weisz, et al. 1993). C'est dans ce compartiment que pourrait avoir lieu la formation du virion.

Dans le cas des glycoprotéines du VHC, on sait maintenant qu'elles interagissent pour former un complexe. Aussi, peut on s'interroger sur la raison pour laquelle chaque protéine porte un signal de rétention alors que celui de la protéine E2 pourrait suffire à retenir le complexe dans le réticulum endoplasmique (voir modèle putatif figure 16).

Plusieurs explications sont possibles. Tout d'abord, les deux protéines doivent être maintenues dans le même compartiment afin qu'elles puissent interagir pour former un complexe. De plus, ce sont ces domaines transmembranaires qui pourraient interagir lors de la formation des complexes natifs non-covalents. Ce sont ces mêmes domaines qui permettent l'ancrage membranaire des protéines. Aussi, il est probable que ces différentes fonctions sont étroitement liées et que la suppression de la fonction de localisation dans le réticulum endoplasmique entraînerait la suppression des autres fonctions.

Ces domaines transmembranaires sont donc probablement des éléments clé de la formation des virions matures, et des études supplémentaires seront nécessaires afin d'en déterminer précisément les différentes fonctions.

II. Etude des glycannes de E1

Comme nous l'avons vu page 32, la protéine E1 du VHC possède cinq sites potentiels de glycosylation, déduits de la séquence en aa de la protéine et localisés en position 196, 209, 234, 305 et 325. Ces glycosylations sont de type N-liées (voir figure 17).

II.1. Rappels de glycobiologie

La glycosylation est la modification co- (et post-) traductionnelle la plus rencontrée pour les protéines de la membrane cellulaire et virale. Bien que, dans le cas de nombreuses protéines, l'influence de la glycosylation sur l'activité biologique ait été clairement définie, la signification de la glycosylation reste énigmatique pour la plupart des protéines .

En raison de sa grande capacité à présenter des structures variables, la glycosylation favorise la diversité et la spécificité des protéines cellulaires et virales. De plus, ce mécanisme étant constitutif chez la cellule, il ne nécessite pas d'information génétique supplémentaire. La diversité des structures glycaniques observée s'explique par la présence conjointe de plusieurs phénomènes. Tout d'abord, comme nous allons le voir, il existe plusieurs types de glycosylation. De plus, pour un même site potentiel, une glycosylation absente, partielle ou complète peut être constatée. Elle est fonction du tissu, du type cellulaire et de l'état de la cellule. Enfin, une microhétérogénéité peut être observée pour les glycannes matures, due à l'acquisition de structures complexes dans l'appareil de Golgi.

Ces phénomènes ont amené à définir les notions de glycoforme et de glycotype (Rademacher, et al. 1988). Les glycoformes d'une protéine définissent une famille de molécules regroupant toutes les formes de glycosylation observées pour tous les sites potentiels d'une protéine donnée. Le glycotype définit le type de glycosylation observé pour une cellule donnée.

La glycosylation n'a pas lieu au hasard, et il est communément admis qu'à un site, une protéine, une cellule et un état cellulaire donné, est associée une structure glycanique constante. Toutefois, nous verrons que cette règle n'est pas absolue et qu'un certain nombre de facteurs peuvent venir perturber la glycosylation normale d'un site potentiel.

II.1.1. Les différents types de glycosylation

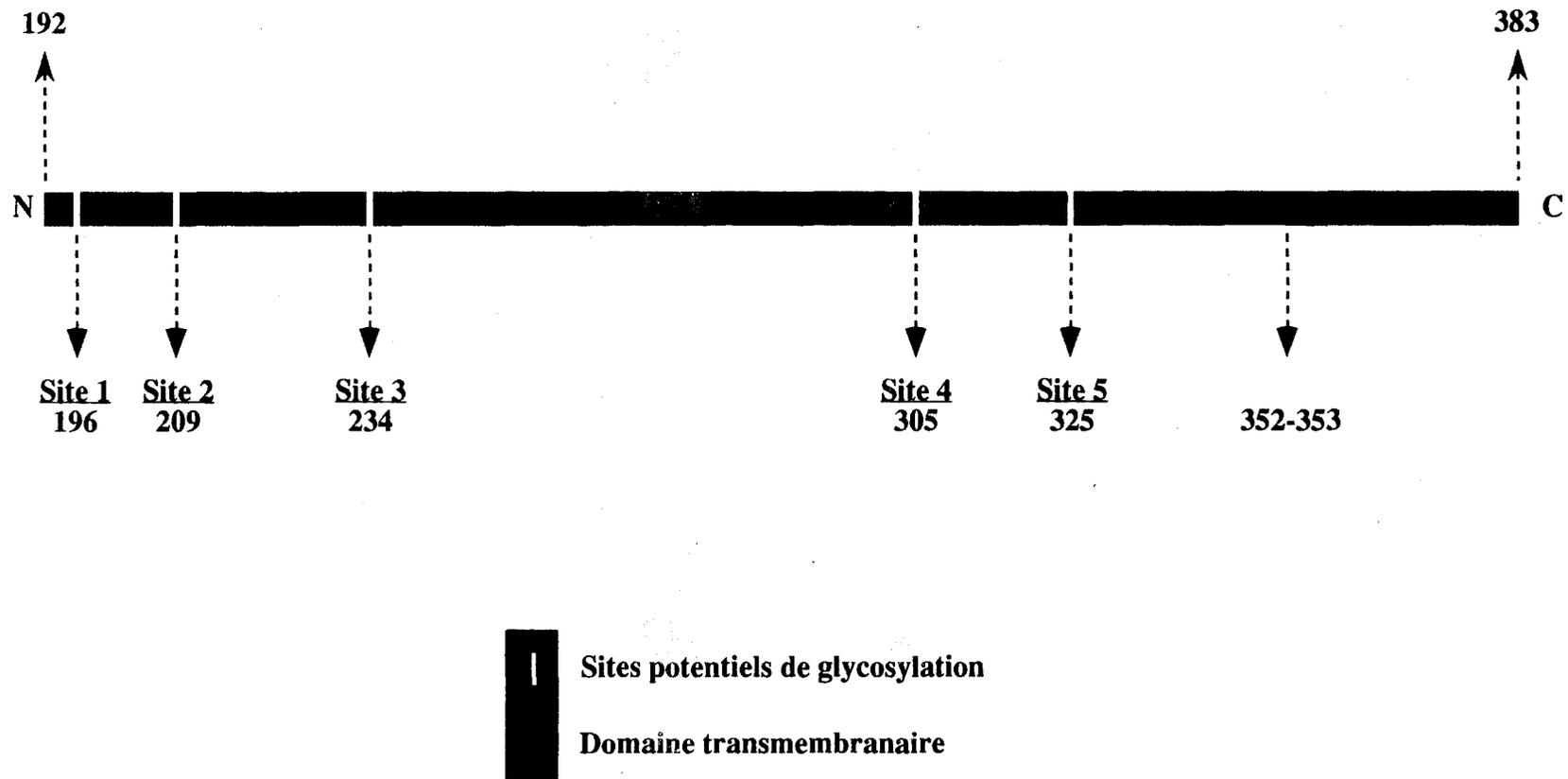


Figure 17 : Sites potentiels de glycosylation de la protéine E1 du VHC

Schématiquement, on peut les classer en quatre catégories:

- La N-glycosylation: la chaîne glycanique est attachée à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique sur l'atome d'azote (N) d'un résidu asparagine.

glycanne--4GlcNAc β 1-N-Asn

- La O-glycosylation: la chaîne glycanique est attachée à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique sur l'atome d'oxygène (O) d'un résidu sérine ou thréonine.

glycanne--4GalNAc α 1-O-Ser/Thr

- La glycosylation des protéoglycannes: la chaîne glycanique est attachée à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique sur l'atome d'oxygène (O) d'un résidu hydroxylysine.

glycanne--2Gal β 1-O-HLys

- Les glycanes faisant partie d'un ancrage GPI : l'extrémité C-terminale d'une protéine est estérifiée sur le groupe amine d'un éthanamine-phosphomannoglycane, lié alors à un groupe phosphatidyl inositol formant ainsi un ancrage GPI.

PI-glycanne-Man-6-P éthanamineNH-CO-CH(R)-NH

La glycoprotéine E1 ne porte que des glycosylations de type N-liées. Aussi, la suite de cette introduction ne sera consacrée qu'à la description des phénomènes ayant trait à la N-glycosylation.

II.1.2. La N-glycosylation

Le point commun entre toutes les chaînes glycaniques observées sur les protéines, est un "core" pentasaccharidique composé de trois mannoses et de deux résidus N-acétylglucosamine. Par la suite, au cours de son transfert à travers le RE, puis éventuellement l'appareil de Golgi, de nombreuses substitutions vont venir apporter une grande diversité structurale. Pour revue, voir (Kornfeld and Kornfeld 1985, Rademacher, et al. 1988).

La première étape de la N-glycosylation intervient très précocement, dans la majorité des cas avant même que la protéine ne soit complètement traduite. Elle se produit donc tout d'abord dans la lumière du RE rugueux, et fait intervenir une glycosyltransférase. Elle est liée à la membrane et permet le transfert "en bloc" du glycanne $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, d'une molécule porteuse, un diphosphodolichol (P-P-Dol), vers un résidu asparagine d'une protéine en cours de traduction. Ce résidu asparagine est intégré dans une séquence tripeptidique consensus **Asn-X Ser/Thr** où le résidu X est un aa quelconque excepté la proline. Le phosphodolichol est une molécule hydrophobe, liée à la membrane, qui permet l'assemblage et l'ancrage du glycanne dans la membrane.

La maturation des glycannes s'effectuant dans le RE et l'appareil de Golgi est résumé figure 18.

II.1.2.a. La glycosylation dans le RE

Trois molécules donneuses de sucre sont nécessaires à l'assemblage du glycanne $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$: le UDP N-acétylglucosamine, le UDP glucose et le GDP manose. Les deux premières étapes (1 et 2) consistent en un transfert successif de deux résidus N-acétylglucosamine-1-phosphate de la UDP N-acétylglucosamine au phosphodolichol. Au cours de l'étape 3, cinq résidus mannoses sont transférés du 5GDPMAN sur l'accepteur lipidique pour donner le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol. Les quatre mannoses et les trois glucoses des étapes 4 et 5 seront quant à eux transférés du nucléotide diphosphate de façon indirecte, par l'intermédiaire d'un glycosyl-phosphodolichol. Après l'étape 5, l'oligosaccharide est alors susceptible d'être transféré sur une protéine naissante. Ce phénomène est celui rencontré pour tous les types de cellules eucaryotes (Elbein 1979, Hubbard and Ivatt 1981, Kornfeld and Kornfeld 1985, Lennarz 1980, Staneloni and Leloir 1982). Ce transfert de l'oligosaccharide sur la protéine va être réalisé par l'enzyme oligosaccharyltransférase (étape a). Il est immédiatement suivi par plusieurs étapes de déglucosylation.

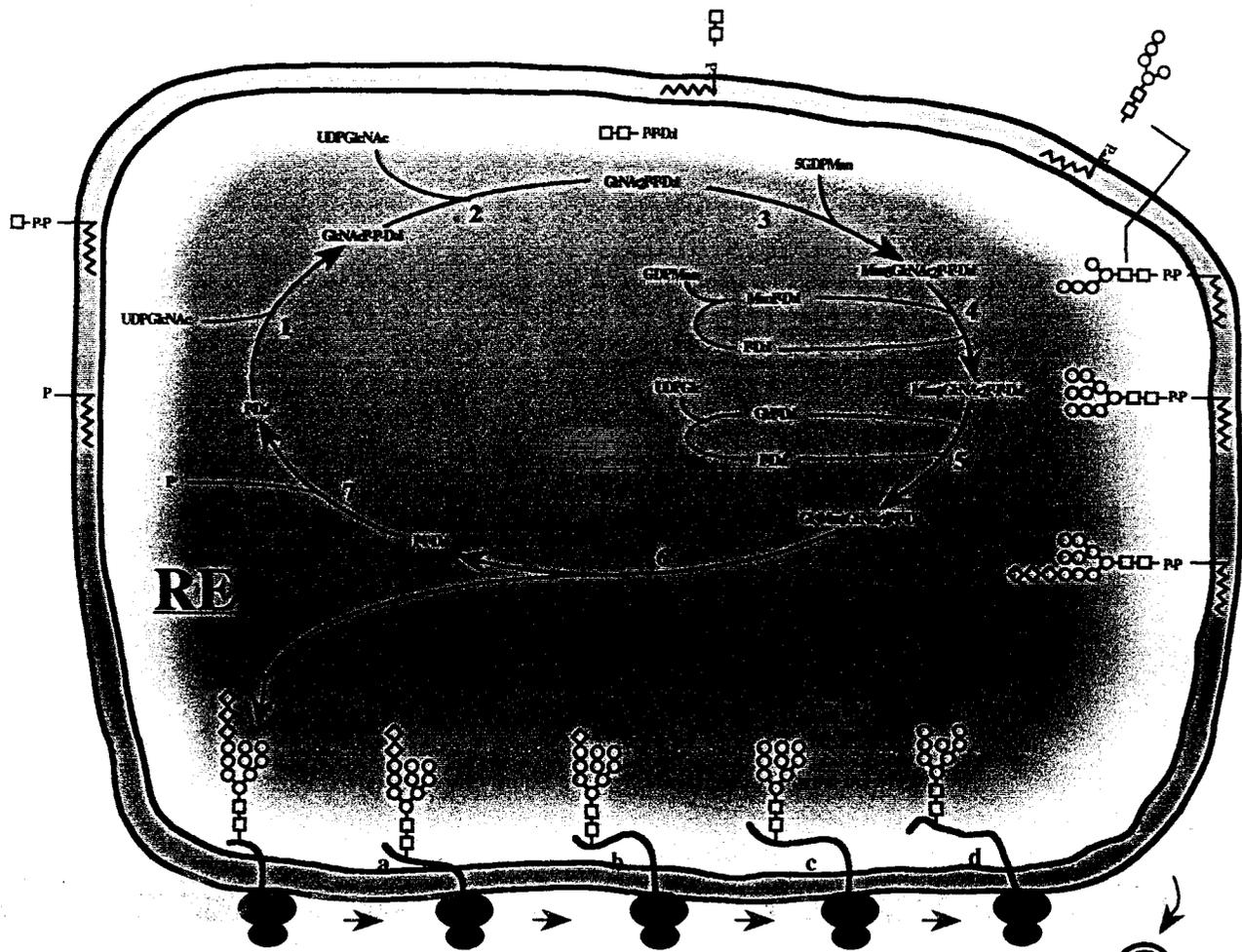
Les premières étapes ont lieu dans le RE. Le glucose terminal est tout d'abord éliminé par une α -glucosidase-I (étape a). Puis, une α -glucosidase-II clive les deux glucoses suivants (étapes b,c). Un premier résidu manose est alors clivé du glycanne par l' α 1-2 mannosidase-I (étape d). La molécule alors obtenue (**Man8GlcNAc2-Protéine**) est la structure qui va permettre à la protéine de quitter le RE pour le cis-Golgi.

Figure 18 : Principe de la N-glycosylation du réticulum endoplasmique au trans-golgi

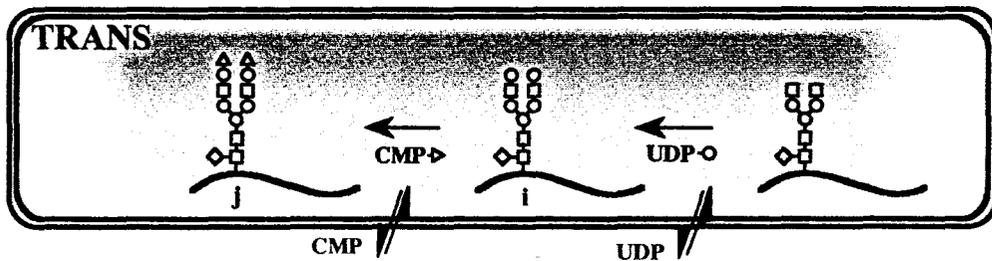
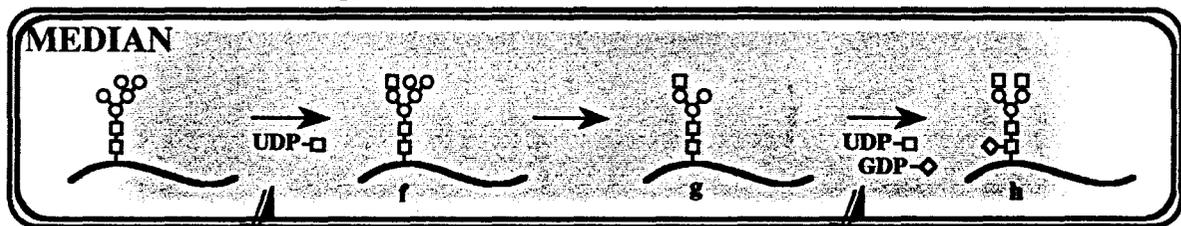
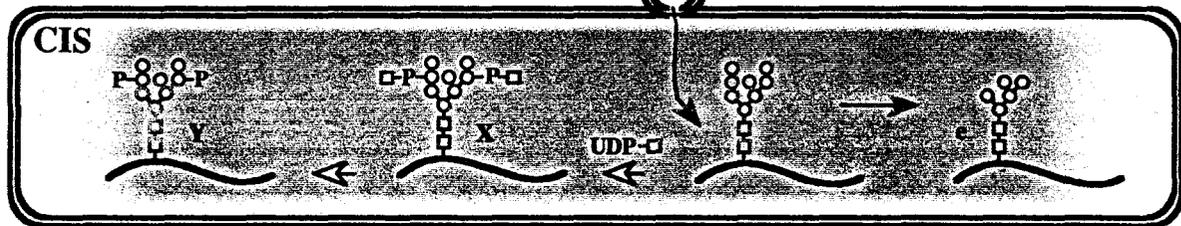
d'après Abeijon et Hirschberg 1992,
Kornfeld et Kornfeld 1985.

Légende

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
|  | N-acétylglucosamine |
|  | Mannose |
|  | Glucose |
|  | Acide sialique |
|  | Fucose |
|  | Galactose |



GOLGI



II.1.2.b. La glycosylation dans l'appareil de Golgi

Dans le cis-Golgi, trois mannoses supplémentaires vont être clivés par l' α -mannosidase-I (étape e).

Les enzymes N-acétylglucosaminylphosphotransférase et N-acétylglucosamine 1-phosphodiester α N-acétylglucosaminidase (respectivement X et Y) vont permettre l'élaboration, dans le cis-Golgi, du motif mannose-6-phosphate sur les glycanes des enzymes lysosomales.

La suite du processus hors hydrolases a lieu dans le Golgi médian. Un résidu N-acétylglucosamine est alors ajouté sur le résidu mannose exposé du "core", par une N-acétylglucosaminyl-transférase-I (étape f) Ceci est un prérequis pour que l'étape suivante ait lieu. L'enzyme Golgienne α -mannosidase-II va alors éliminer les deux résidus mannoses encore fixés au "core" (étape g). Cela permet l'addition d'un résidu N-acétylglucosamine sur le mannose ainsi exposé, par la N-acétylglucosaminyltransférase-II (étape h). Un résidu fucose peut alors être transféré sur la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine par une fucosyltransférase (étape h). Il faut noter que cette étape peut avoir également lieu dans le trans-Golgi. La protéine est transportée dans le trans-Golgi où deux résidus galactoses sont ajoutés par l'intermédiaire d'une galactosyltransférase (étape i). Enfin, une sialyltransférase va catalyser l'addition de deux résidus acide sialique (étape j).

A cette étape, le glycanne a atteint sa forme mature, il peut alors quitter l'appareil de Golgi vers sa destination finale

II.1.2.c. Processus de "glycosylation-déglycosylation"

Le processus de clivage des deux premiers glucoses du glycanne $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ par les enzymes α -glucosidase-I et α -glucosidase-II s'effectue dans le RE. Il fait donc apparaître une forme monoglucosylée. C'est cette forme qui va interagir avec les chaperons du RE, telles la calnexine et la calréticuline, comme nous l'avons exposé page 39 de ce chapitre. Initialement, l'association de la glycoprotéine et du chaperon est médiée par le résidu de Glc du carbohydrate (a), puis une forte interaction protéine-protéine la remplace (b) (voir figure 13). La libération de la protéine partiellement repliée a lieu grâce à la déglycosylation de celle-ci par l' α -glucosidase-II. Si la protéine a acquis une conformation correcte, elle va continuer sa progression le long de

la voie de glycosylation tel que cela vient d'être décrit. Si la protéine est mal repliée, il intervient alors une étape de reglucosylation du glycanne $\text{Man}_9\text{GlucNAc}_2$ (Parodi, et al. 1983).

Cette reglucosylation est effectuée par une enzyme spécifique: l'UDP-Glucose: glycoprotein glucosyltransferase, une protéine soluble du RE. Elle s'effectue spécifiquement sur les protéines incorrectement repliées et non sur les protéines "natives", grâce à des interactions avec les aa hydrophobes exposés à la surface des protéines mal repliées [Trombetta, 1992 #506; Sousa, 1995 #505].

La forme monoglucosylée peut donc se fixer à nouveau sur la calnexine. La glycoprotéine en cours de maturation sera maintenue dans ce cycle de glycosylation-déglucosylation jusqu'à ce qu'elle soit convenablement repliée. Dans ce cadre, la glycoprotéine glucosyltransférase agit donc comme un "senseur" de l'état de maturation de la protéine.

II.1.2.d. Contrôle de la glycosylation

La description de la voie de glycosylation représente une illustration des processus permettant la formation d'un oligosaccharide complexe à partir du "core" de départ. Cependant, l'oligosaccharide complexe utilisé pour le propos n'a rien de consensuel et un grand nombre de formes complexes différentes peuvent être observées à l'issue de ce processus. Ainsi, la structure dont l'élaboration vient d'être décrite est le modèle "à deux antennes". Un variant "à quatre antennes" peut également être observé. Sa présence dépend de la présence et de la spécificité des enzymes N-acétyl-glucosaminyltransférases intervenant lors de l'étape h.

La grande variété de formes complexes observée suggère qu'un nombre également important de glucosyltransférases différentes sont présentes dans les compartiments du RE et de l'appareil de Golgi. Mais la présence relativement discrète des enzymes dans ces compartiments ainsi que leur grande hydrophobicité rend leur étude difficile. Néanmoins, plusieurs études sont venues apporter des informations sur la nature et les propriétés de ces molécules. Ces informations sont réunies dans les publications suivantes: (Beeley 1985, Beyer, et al. 1981, Schutzbach, et al. 1987).

La nature de la structure finale dépend donc, comme cela est indiqué pour la forme "à quatre antennes", des enzymes présentes dans les compartiments de la voie de synthèse. Cette répartition des enzymes est déterminée principalement par le contexte cellulaire, le type cellulaire, la nature du tissu et l'espèce considérée.

→ Influence de l'espèce

Ainsi, une même glycoprotéine exprimée dans un même type cellulaire ayant pour origine des espèces variées, va mener à une glycosylation qui sera spécifique de l'espèce considérée. Par exemple, la glycoprotéine α 1-acide de rat est N-glycosylée d'une manière tout à fait différente de celle de la glycoprotéine α 1-acide humaine (Yoshima, et al. 1981). Les différences résident dans le nombre d'"antennes", les fucosylations et les "bras" annexes branchés sur l'oligosaccharide complexe. De même, les nombreuses études concernant la glycosylation de la γ -glutamyl transpeptidase du foie et du rein chez le veau, la souris et le rat, ont apporté le même type de résultats. Les glycosylations sont spécifiques aux espèces étudiées et elles diffèrent par la complexité et le degré de sialylation des glycanes matures (Kobata 1984, Yamashita, et al. 1985).

La BSSL (Bile-salt-stimulated lipase) est une enzyme présente dans le lait maternel humain. La glycosylation de cette protéine a été étudiée chez des donneurs humains et en système cellulaire (ovaire de cochon d'Inde et lignée fibroblastique de souris C-127) à l'aide d'une protéine recombinante (Landberg, et al. 1997). L'auteur montre que de nombreuses différences apparaissent, en ce qui concerne la composition des glycanes, entre les protéines de donneurs et celles exprimées en système cellulaire. Ces différences sont liées au nombre de molécules d'acide sialique et de fucose incorporées à la structure complexe.

Il semble que les différences observées entre les espèces puissent amener à des incompatibilités des glycoformes d'une espèce à l'autre. Ainsi, Galili et al. ont étudié l'épitope Gal α 1 \rightarrow 3gal qui est une structure présente dans différents tissus chez plusieurs espèces (Galili, et al. 1987). Ils ont montré que ce motif est présent chez les "new world monkeys" et les mammifères, et absent chez les "old world monkeys". Or, chez ces derniers, ils mettent en évidence un taux très important d'anticorps dirigés contre ce motif, ce qui n'est pas le cas pour les deux premières espèces ci-dessus. Il reste à comprendre qui, des anticorps ou du motif Gal α 1 \rightarrow 3gal, détermine la présence de l'autre.

Ces phénomènes de glycosylation différentielle peuvent également participer à des processus de résistance cellulaire vis à vis des infections virales. Ainsi, l'infection par le virus vaccine a été étudiée dans des lignées cellulaires ayant plusieurs origines: hépatome de rat (KRC7), rein de singe vert d'Afrique (CVI-L) et fibroblaste de rat (L929) (Bose, et al. 1997). La lignée KRC7 résiste à l'infection virale alors que les deux autres lignées sont sensibles. L'auteur montre que cette résistance est dépendante de la déglycosylation d'une protéine clé de l'infection virale (page 67), ce qui la rend inactive. Ces exemples illustrent bien la spécificité des phénomènes de glycosylation entre les espèces.

Enfin, des différences beaucoup plus fines que l'espèce d'origine du type cellulaire utilisé pour l'étude peuvent donner lieu à des modifications de la structure des glycanes complexes.

→ Influence du contexte cellulaire

Ainsi, dans une étude récente, Némansky a montré que les différents stades de la grossesse pouvaient entraîner la modification de la glycosylation d'une protéine placentaire, la Glycoprotéine hormone alpha subunit (Nemansky, et al. 1998). Il observe, au cours de la grossesse, une augmentation du nombre de structures de type "triantenné" branchées sur le "core" des glycanes, et de fucosylations fixées sur ce dernier. Selon l'auteur, cette modification est à mettre en rapport avec une régulation différentielle de deux enzymes de la voie de glycosylation, les N-acetylglucosaminyltransférases IV et V et la α -6-fucosyltransférase.

Une autre étude, réalisée par l'équipe de Kobata, rapporte le même type de phénomène (Asada, et al. 1997). Ce travail a été réalisé sur des lignées transformées de type NIH3T3, MTA_g, MTP_y, MT1. Les développements respectifs de ces lignées dans une souris athymique, présentent plusieurs différences: la lignée MTA_g pousse plus rapidement que la lignée MTP_y, alors que les lignées MT1 et NIH3T3 ne poussent pas. De plus, seule la lignée MTA_g est capable de métastaser dans les poumons. Les études structurales des N-glycanes des protéines de la membrane cellulaire de ces lignées, ont révélé des différences notables dans la composition des glycanes complexes. Pour les lignées prises dans l'ordre suivant, NIH3T3, MT1, MTP_y, MTA_g, on observe une présence de moins en moins importante des structures à "deux antennes" branchées sur le "core", et une présence croissante des structures à "trois" et "quatre antennes". Les auteurs mettent en corrélation ces différences de structure et les propriétés de la lignée MTA_g, c'est à dire une capacité à former des tumeurs diminuée et des propriétés d'adhérence *in-vivo* altérées.

II.1.2.e. La glycosylation dans d'autres compartiments cellulaires

Bien que la majeure partie des processus de glycosylation aient lieu comme cela a été décrit page 59, il apparaît aujourd'hui de plus en plus évident que ces phénomènes peuvent également avoir lieu dans le noyau, les mitochondries et même le cytoplasme (Hart, et al. 1988). Ainsi, la présence de phosphodolichol dans les membranes n'appartenant pas au RE et à

l'appareil de Golgi, semble maintenant être une évidence. Cependant, les problèmes de contamination des membranes étudiées par celles du RE et de l'appareil de Golgi, compliquent les études s'attachant à explorer ces phénomènes. Néanmoins, les études qui se sont particulièrement attachées à éliminer ce biais expérimental, attestent toujours de la présence de phénomènes de glycosylation dans le noyau et les mitochondries (Ardail, et al. 1985, Fayet, et al. 1988).

Il reste maintenant à définir la nature des protéines ainsi glycosylées ainsi que l'importance relative d'un tel phénomène.

II.1.3. *Défauts de glycosylation et pathologie*

Ces processus de glycosylation interviennent donc dans la maturation de très nombreuses protéines. Cette large prévalence ainsi que les diverses fonctions qui semblent attachées à ces oligosaccharides, suggèrent qu'un dysfonctionnement de la voie de biosynthèse des glycannes peut se traduire par l'apparition de pathologies particulières.

Stanley et al. ont observé l'impact d'un tel dysfonctionnement en système cellulaire et chez la souris. Ils montrent que la N-glycosylation est essentielle pour la viabilité de la cellule et de l'organisme. Ainsi, une souris avec un gène codant la N-acetylglucosamine transférase I inactivé ne parviendra pas à la fin de la gestation (Stanley and Loffe 1995).

Chez l'homme, le nombre de pathologies mises en rapport avec de tels dérèglements croît régulièrement.

Les premières pathologies à avoir été mises en évidence ont été la mucopolidose II et la mucopolidose III (pseudo-Hurler polydystrophie) (Reitman, et al. 1981). Ici, l'absence de N-acetylglucosaminyl-phosphotransférase fonctionnelle rend impossible l'élaboration du motif mannose-6-phosphate présent sur les glycannes des enzymes lysosomales natives (voir page 61). Cela entraîne une inhibition du transfert des hydrolases de l'appareil de Golgi aux lysosomes. L'accumulation des hydrolases dans l'appareil de Golgi sera à l'origine des deux pathologies.

Par la suite, d'autres affections ayant pour origine des désordres de la voie de glycosylation ont été décrites. Anémie dysérythropoïétique type II où l'absence des enzymes α -mannosidase II et N-acetylglucosaminyltransférase II entraîne la présence de glycoprotéines altérées sur les érythrocytes (Fukuda, et al. 1987, Fukuda, et al. 1990). Syndrome d'altération de l'adhésion leucocytaire type II où on note un défaut du donneur de fucose, le GDP-fucose. Cette

anomalie s'illustre par une incapacité de l'organisme à mobiliser les granulocytes sur les sites d'infection, menant à des infections bactériennes récurrentes (Etzioni, et al. 1992).

En 1980, Jaeken et al. ont décrit un nouveau type d'affection qui fut appelée syndrome de déficience en carbohydate des glycoprotéines (CDGS: carbohydate-deficient glycoprotein syndrome) (Jaeken, et al. 1980). Il est lié à un grand nombre de dérèglement se développant dès l'enfance: troubles neurologiques sévères, anomalies osseuses, lipodystrophie et perturbation des propriétés de coagulation du sang. Au moins quatre sous-types de ce syndrome ont été documentés, le plus courant étant le type I (Stibler, et al. 1995). Ces perturbations sont liées à une glycosylation incomplète des protéines entraînant un repliement anormal de celles-ci et une altération de leurs propriétés. Selon les sous-types, l'origine en est différente.

Pour le type I, la plupart des patients sont dépourvus de phosphomannomutase, l'enzyme qui convertit le mannose-6-phosphate en mannose-1-phosphate (Matthijs, et al. 1997). En définitive, ceci compromet la formation du glycanne $\text{Gluc}_3\text{Man}_9\text{GlucNAc}_2$ sur le P-P-Dol. D'autres études très récentes décrivent des CDGS type I liées au défaut d'une autre enzyme: la phosphomannose isomérase (De Koning, et al. 1998, Niehues, et al. 1998). Les signes cliniques sont également différents.

Une étude récente décrit deux patients présentant une CDGS de type II avec des caractéristiques inhabituelles. En effet, l'enzyme faisant défaut ici est la N-acétylglucosaminyl-transférase II (Tan, et al. 1996). Cela montre qu'un syndrome multifactoriel sévère du type CDG peut également être entraîné par une anomalie de la construction du glycanne complexe.

De nombreux autres exemples sont décrits dans la littérature, et on peut se rapporter, pour revue, aux articles suivants: (Kornfeld 1998, Rademacher, et al. 1988).

Les signes cliniques illustrant les anomalies de glycosylation étant, comme nous l'avons vu, extrêmement divers, il est raisonnable d'envisager qu'un nombre de plus en plus grand de pathologies trouveront leur explication dans des phénomènes de glycosylation anormale.

II.1.4. Facteurs influençant l'efficacité de glycosylation

Un grand nombres de facteurs peuvent exercer une contrainte sur l'efficacité avec laquelle un site potentiel donné pourra être glycosylé.

→ Distance entre le site de glycosylation et la membrane du RE

Pour les protéines ancrées dans la membrane du RE, il semble qu'une distance minimum doive être respectée entre le site potentiel et la membrane, pour que le transfert "en

bloc" du glycanne initial sur la protéine puisse avoir lieu. Cette distance a été évaluée à 12-14 aa ou 30-40 Å par Nilsson et Von Heijne (Nilsson and Von Heijne 1993). Les auteurs suggèrent que cette distance est nécessaire pour que le site de glycosylation soit accessible au site actif de l'oligosaccharyltransférase.

→ Présence du site à proximité d'une extrémité N- ou C-terminale

D'une façon plus générale que dans le paragraphe précédent, il semble qu'un site localisé à l'extrémité N- ou C-terminale soit moins efficacement glycosylé que sur le reste de la protéine. L'étude réalisée par Livi sur l'interleukine-1 β montre que le seul site de la protéine (Asn7-Cys-Thr), situé près de l'extrémité N-terminale, n'est glycosylé qu'avec une efficacité de 50% (Livi, et al. 1991). En augmentant la distance entre l'extrémité N-terminale de la protéine et ce site, il parvient à restaurer une glycosylation totalement efficace.

→ Influence du repliement sur la glycosylation des protéines

Les processus de transfert des oligosaccharides initiaux sur les protéines, ont lieu en même temps que les premières étapes du repliement de celles-ci, alors que la traduction de la protéine n'est pas encore terminée. Cela suggère donc que ces deux phénomènes, repliement et glycosylation, s'influencent mutuellement. De nombreuses expériences sont venues confirmer cette hypothèse, mais aucune règle générale ne peut être édiflée. En effet, selon la nature de la protéine, et même selon la nature d'un site donné, un phénomène précédera l'autre, et l'un pourra favoriser ou inhiber le bon déroulement de l'autre.

Plusieurs études ont montré que la formation des ponts disulfures pouvait perturber la formation du glycanne complexe. Hasegawa rapporte que la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 45 et 51 de l'interleukine-6, gêne considérablement la glycosylation sur l'asparagine 46 (Hasegawa, et al. 1992). En éliminant la formation de ce pont, il augmente l'efficacité de glycosylation sur ce site. McGuinness et al. ont réalisé le même type de travail sur l'hémagglutinine-neuraminidase du virus de la maladie de newcastle (McGuinness and Morrison 1997). Ils montrent qu'en substituant les cystéines 13 et 14, ils permettent la fixation d'un glycanne supplémentaire sur la protéine. Le travail d'Allen et al. sur l'activateur de plasminogène tissulaire décrit un phénomène semblable (Allen, et al. 1995). L'inhibition de la formation des ponts disulfures va favoriser la mise en place des structures complexes des glycanes. Cette compétition entre repliement et glycosylation est également décrite par Holst et al. (Holst, et al. 1996).

→ Nature des acides aminés constituant la séquence cible: Asn-X-Ser/Thr-Y

Comme nous l'avons vu page 59, la N-glycosylation a lieu sur l'asparagine d'un triplet Asn-X-Thr/Ser. Toutefois, quelques rares exemples de N-glycosylation se produisant sur l'aa Asn d'un séquon dont la séquence en aa est différente de celle habituellement admise, ont été observés. Ainsi, plusieurs auteurs rapportent qu'un phénomène de glycosylation peut être observé sur un triplet Asn-X-Cys (Bause and Legler 1981, Grinnell, et al. 1991, Stenflo and Fernlund 1982). L'étude de Gavel et al. confirme cette observation et décrit une nouvelle séquence pouvant être la cible d'un phénomène de glycosylation, Asn-Gly-Gly-Thr (Gavel and Von Heijne 1990). Néanmoins, ces exemples restent largement marginaux.

- AA en position trois

Plusieurs études ont déterminé les différences d'efficacité de glycosylation présentées par des séquons contenant la Ser ou la Thr en position 3. Par l'utilisation de peptides contenant une séquence potentielle de glycosylation, certaines études ont pu mettre en évidence, *in-vitro*, que la Thr en position 3 était liée à une efficacité de glycosylation plus importante que pour la Ser, de l'ordre de deux à trois fois (Gavel and Von Heijne 1990, Kaplan, et al. 1987). Cependant, ces travaux ne se sont pas attachés à déterminer l'influence respective de ces deux aa sur des séquons de protéines naturellement glycosylées. L'étude réalisée par Kasturi et al. concerne la glycoprotéine du virus de la rage (RGP), une protéine portant trois sites potentiels de glycosylation, dont deux seulement sont efficacement glycosylés (Kasturi, et al. 1995). Le site 1, constitué par la séquence Asn-Leu-Ser est celui qui est très faiblement glycosylé. La substitution de la Ser par une Thr entraîne une augmentation considérable de l'efficacité de glycosylation. Au contraire, la substitution de la Ser par une Cys au site 1 va bloquer totalement la glycosylation.

Les différents travaux réalisés sur ce sujet permettent de classer les trois aa Cys, Ser, Thr en fonction de l'efficacité de glycosylation liée à leur présence en position 3 du séquon Asn-X-Ser/Thr/Cys:

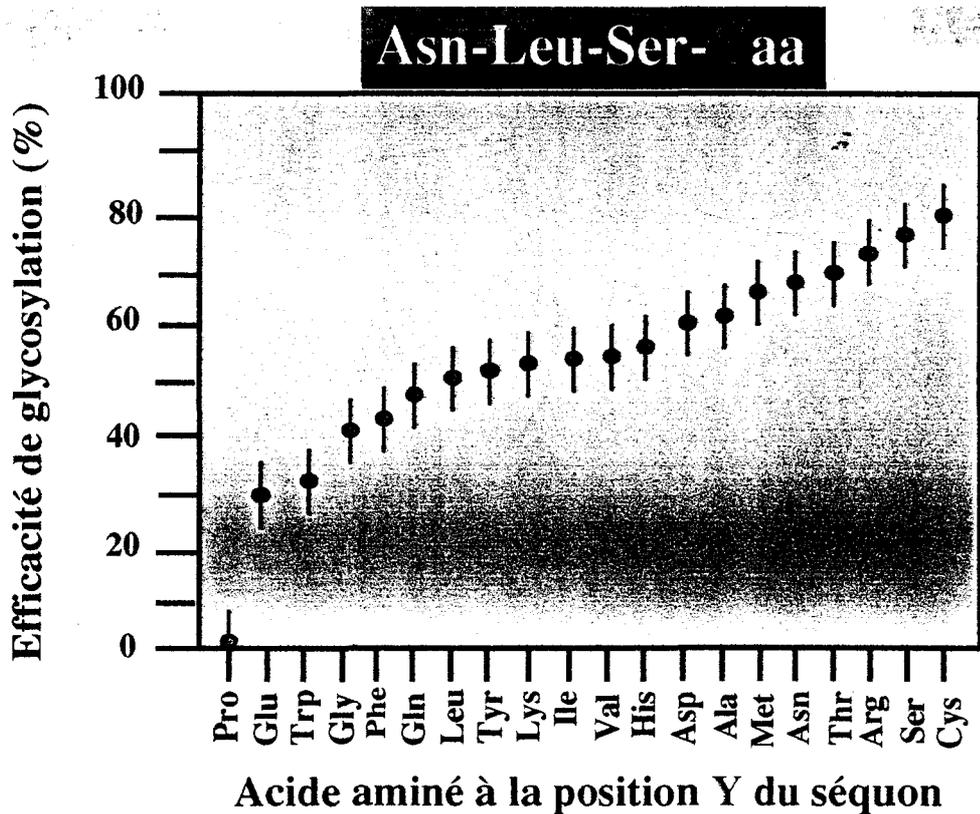
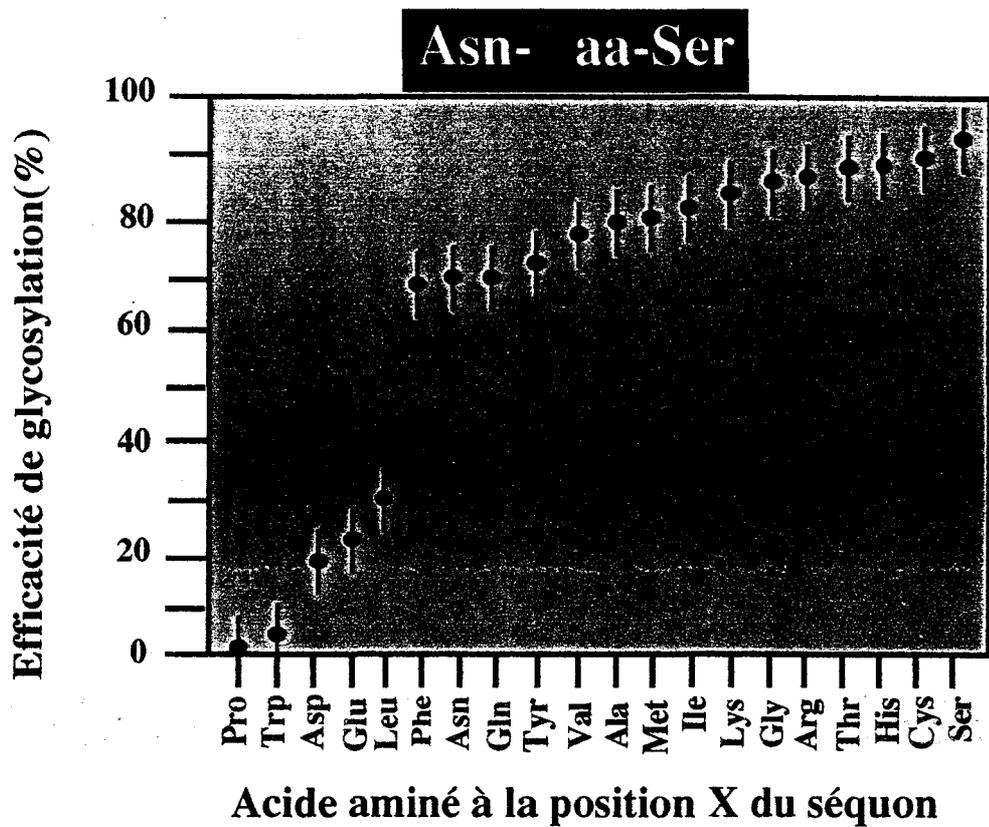
Thr >> Ser >> Cys

Il faut toutefois souligner que la présence d'une cystéine en position trois du séquon reste un cas exceptionnel.

- AA en position deux

L'aa présent en position 2 du séquon peut influencer fortement l'efficacité de glycosylation. Plusieurs études rapportent que certains acides aminés sont rarement retrouvés en

Figure 19 : Efficacité de glycosylation en fonction des acides aminés X et Y
 D'après Shakin-Eshleman S. H. 1996, Mellquist J. L. 1998.



position deux sur des séquons naturellement glycosylés. C'est le cas pour la Cys et le Trp (Kaplan, et al. 1987), l'Asp (Marshall 1974) et la Glu. Des études de glycosylation réalisées, *in-vitro*, à l'aide de peptides synthétiques mettent également en évidence un effet inhibiteur de l'Asp à cette position (Bause and Hettkamp 1979, Imperiali and Shannon 1991). Plus récemment, une étude systématique de l'influence des aa en position deux sur la glycosylation a été réalisée à l'aide de la protéine RGP en système *in-vitro* (Shakin-Eshleman, et al. 1996). Ce travail montre que les aa les plus défavorables à la glycosylation sont, sans compter la Pro, le Trp, l'Asp, la Glu et la Leu (voir figure 19).

Bien que les mécanismes de ce phénomène d'inhibition soient encore mal compris, certaines caractéristiques de ces aa peuvent suggérer une explication. En effet, on peut remarquer que le Trp, la Leu, la Phe et la Tyr sont des aa hydrophobes de grande taille. Ils pourraient donc gêner l'accessibilité au séquon de l'oligosaccharyltransférase (Shakin-Eshleman, et al. 1996). De même, l'Asp et la Glu sont des aa chargés négativement. Cette charge pourrait influencer la capacité de l'oligosaccharyltransférase à fixer simultanément le séquon et le phosphodolichol chargé lui aussi négativement (Bause and Hettkamp 1979, Imperiali and Shannon 1991).

Il faut souligner que dans le cas de la RGP, le séquon Asn-Cys-Ser est efficacement glycosylé (Shakin-Eshleman, et al. 1996), alors qu'en règle générale, les séquons comprenant une Cys en position deux apparaissent difficilement glycosylables. Ceci est très probablement lié au fait que la Cys peut participer à la formation d'un pont disulfure qui, comme nous l'avons vu précédemment, est fortement préjudiciable à la glycosylation (Bause, et al. 1982, Bulleid, et al. 1992).

- AA en position quatre

Très tôt, plusieurs auteurs ont suggéré que les aa situés à proximité du séquon pouvaient exercer une influence sur la glycosylation de celui-ci. Il a été postulé que cette action s'exerçait par une participation à l'établissement d'une conformation du séquon favorable à sa glycosylation ou par une modulation du potentiel des différents groupes fonctionnels du séquon à participer à la réaction de glycosylation (Bause, et al. 1982).

Dans ce cadre, nous avons déjà vu qu'une cystéine localisée à proximité du séquon pouvait inhiber la glycosylation (Hasegawa, et al. 1992, Kane 1993) (voir "Influence du repliement sur la glycosylation des protéines"). De même, il a été décrit à plusieurs reprises qu'une proline située immédiatement après le séquon pouvait bloquer la glycosylation (Bause 1983, Gavel and Von Heijne 1990, Roitsch and Lehle 1989).

Très récemment, une étude systématique de l'influence de l'aa en position quatre sur la glycosylation, a été effectuée par l'équipe de Shakin-Eshleman (voir figure 19) (Mellquist, et al. 1998). Ce travail a été réalisé dans un contexte Asn-Leu-Ser-Y et Asn-Leu-Thr-Y. Il a été montré que, si l'aa en position quatre exerce une faible influence sur la glycosylation dans un contexte Asn-Leu-Thr-Y, sa nature est déterminante dans un contexte Asn-Leu-Ser-Y (voir figure 18). Certains aa exercent une action négative que ce soit en position X ou Y (Trp et Glu) alors que pour d'autres, l'influence est plus contradictoire (Asp et Gly).

Enfin, nous pouvons remarquer à la lumière de cette étude et de celle commentée dans le paragraphe précédent (Shakin-Eshleman, et al. 1996) que la Cys en elle-même exerce une influence positive sur l'efficacité de glycosylation. C'est sa capacité à former des ponts disulfures avec une autre Cystéine qui défavorise un séquen à être glycosylé. Il est donc concevable qu'une cystéine qui n'est pas impliquée dans la formation des ponts disulfure sera un élément favorisant fortement la glycosylation.

→ Influence des sites les uns sur les autres

Dans le cas de la RGP, il semble que les trois sites n'exercent aucune influence les uns sur les autres. En effet, lorsque les deux seuls sites naturellement glycosylés de la protéine (2 et 3) sont inactivés, cela ne restaure pas la glycosylation sur le site 1 (Shakin-Eshleman, et al. 1992). De la même façon, lorsque la glycosylation du site 1 est restaurée par mutagenèse dirigée, cela n'influence en rien la glycosylation des deux autres sites (Kasturi, et al. 1995). Cette absence d'interaction entre les différents sites d'une protéine a également été observée sur l'ovalbumine (Sheares 1988).

A l'inverse, l'étude réalisée sur la protéine C humaine par Grinnell et al. (Grinnell, et al. 1991) montre que la glycosylation sur le site Asn97 influence directement l'efficacité de glycosylation sur le site Asn329. De même, l'équipe de Friedrich met également en évidence ce type de phénomène sur la gp55 du "Friend spleen focus-forming virus" (Rau, et al. 1993). Les auteurs montrent que l'inactivation du site 3 va entraîner la glycosylation sur un site normalement non-glycosylé, correspondant à l'Asn378.

Il n'y a donc vraisemblablement pas de règle générale en ce qui concerne ce phénomène, et l'influence des sites les uns sur les autres doit être envisagée au cas par cas.

II.1.5. Influence de la glycosylation sur différents phénomènes

La N-glycosylation influence les propriétés biologiques d'un grand nombre de protéines. L'étendue des phénomènes faisant intervenir la glycosylation est extrêmement vaste et réévaluée en permanence. Ainsi, elle intervient dans des processus aussi divers que le transport intracellulaire, la stabilité protéique, l'activité biologique, l'antigénicité... . On peut également remarquer qu'un profil de glycosylation aberrant est un des traits les plus communs du phénotype des cellules malignes et que les glycanes sont souvent impliqués dans les désordres auto-immuns (pour revue, voir (Delves 1998, Galli, et al. 1997, Opendakker, et al. 1993, Rademacher, et al. 1988)).

Cette liste n'est pas exhaustive et nous ne traiterons dans ce mémoire que les cas de figure les plus en rapport avec notre travail.

II.1.5.a. Influence de la glycosylation sur le repliement

De nombreux travaux ont mis en évidence que la présence des glycanes sur la protéine pouvait influencer le processus de repliement. Ainsi, dès 1982, Olden et al. montraient que lorsque l'addition des glycanes sur une protéine est bloquée, le repliement correct de celle-ci n'a plus lieu. Elle s'accumule alors dans le RE et forme des agrégats (Olden, et al. 1982). Par la suite, de nombreuses expériences réalisées sur des protéines sécrétées confirmaient que l'inhibition de la glycosylation pouvait entraîner un mauvais repliement de la protéine et par conséquent, une inhibition de la sécrétion. Ainsi, le travail réalisé par l'équipe de Klenk sur l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza A décrit bien ce phénomène (Roberts, et al. 1993). Ils montrent que, non seulement, les glycanes de la protéine agissent synergiquement pour favoriser le repliement de celle-ci, mais qu'ils favorisent également la stabilisation de l'hémagglutinine et la formation d'un homotrimère de HA.

Ce phénomène a été décrit pour des protéines de natures très diverses:

- Récepteurs: Gehle et al. montrent que, en ce qui concerne le récepteur à l'acétylcholine, les glycanes sont indispensables pour que d'importants domaines fonctionnels des sous-unités du récepteur puissent se replier correctement (Gehle, et al. 1997). De même, Rickert et al. ont étudié l'influence de la glycosylation sur la formation du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Rickert and Imperiali 1995). Ils montrent que les glycanes ont une forte incidence sur l'isomérisation des prolines, la formation des ponts disulfures et par conséquent, le repliement de la protéine.

- Enzymes: L'étude réalisée par Zhu sur la α -N-acétylgalactosaminidase montre que la présence des glycanes est indispensable pour un repliement correct, et une résistance à la dégradation de la protéine, même si l'activité de l'enzyme ne semble pas dépendre de la glycosylation (Zhu, et al. 1998). De la même façon, Martina et al. rapportent que la N-glycosylation est nécessaire pour que la GD3 synthase puisse se replier correctement et atteigne une conformation catalytiquement active (Martina, et al. 1998). Ici par contre, l'activité de l'enzyme est étroitement liée à une glycosylation correcte.

- Protéines virales: En inhibant l'action de l' α -glucosidase dans des cellules infectées par le virus de l'hépatite B, Lu et al. mettent en évidence que les glycoprotéines du virus vont suivre une voie de repliement incorrect et être retrouvée sous la forme d'agrégats dans les lysosomes (Lu, et al. 1997). Un phénomène similaire est décrit par Mirazimi et al. pour la protéine VP7 des rotavirus (Mirazimi and Svensson 1998). Ils montrent que la glycosylation est un prérequis à la formation de ponts disulfures corrects. L'absence des glycanes sur la protéine va entraîner un repliement aberrant et la formation d'agrégats.

II.1.5.b. Influence de la glycosylation sur la voie de sécrétion

Nous avons déjà discuté de l'importance des glycanes pour le repliement des glycoprotéines et l'association avec les chaperons du RE. Mais leur influence s'exerce également en aval, sur la voie de sécrétion des protéines. Il semble néanmoins qu'il faille établir une distinction entre les protéines sécrétées et les protéines membranaires. Le transport correct de ces dernières à la membrane plasmique serait étroitement lié à la présence des glycanes, alors que les protéines sécrétées subiraient assez peu l'influence de la glycosylation (Fiedler and Simons 1995). Ainsi, plusieurs études réalisées sur différentes protéines sécrétées ont montré que leur transport n'était pas dépendant de la glycosylation (voir (Newton, et al. 1987)) alors que de très rares exemples de protéines membranaires ne subissant pas l'influence des glycanes sont documentés. On peut relever par exemple le cas des protéines du CMHI qui, lorsque leur glycosylation est bloquée, sont transportées avec la même cinétique à la surface cellulaire que les même protéines glycosylées (Ploegh, et al. 1981).

Toutefois, de nombreuses études récentes semblent venir moduler fortement ces observations et indiquer que la glycosylation peut également exercer une forte influence sur le comportement des protéines sécrétées.

Les exemples que nous allons rapporter peuvent paraître contradictoires, mais ils indiquent simplement que l'influence des glycanes est spécifique de la protéine étudiée.

Muylaert et al. montrent que la protéine NS1 des flavivirus modifiée sur le premier ou l'ensemble de ses deux sites de glycosylation, n'est plus sécrétée (Muylaert, et al. 1996). De même, l'effet de la perturbation de la glycosylation sur la protéine M du virus de l'hépatite B a été étudié par Mehta et al. Ils rapportent, qu'en présence de N-butyl-déoxynojirimycine, un inhibiteur de l' α -glucosidase, la protéine M n'est plus sécrétée et qu'elle est retrouvée dans les vésicules lysosomales sous une forme hyperglucosylée (Mehta, et al. 1997). Wojczyk et al. décrivent un phénomène similaire en ce qui concerne la glycoprotéine du virus de la rage. Ils montrent que la sécrétion d'une forme soluble de cette protéine est étroitement liée à la présence d'une glycosylation sur le site Asn319 (Wojczyk, et al. 1998). Enfin, on peut également citer l'étude de Bonen et al. sur l'apolipoprotein[a]. La présence de tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation peut abolir la sécrétion des formes 9 et 17K-IV de la protéine (Bonen, et al. 1998).

Il existe dans la littérature de nombreux autres exemples relatant un phénomène similaire, mais également un certains nombre de contre-exemples.

C'est le cas pour l'enzyme ACE (pig lung angiotensin I-converting enzyme). L'équipe de Giboudeau a montré qu'en présence de tunicamycine, l'enzyme était normalement sécrétée par des cellules endothéliales (Baudin, et al. 1997). Plus généralement, la glycosylation semble avoir peu d'influence sur les propriétés structurales et biologiques de l'ACE. Le même phénomène a été relevé par Chuang et al. pour l'anticorps IgA1. Les protéines modifiées sur l'un ou sur l'ensemble des deux sites de glycosylation sont efficacement sécrétées par des lignées myélomateuses, sous forme de monomères ou de dimères (Chuang and Morrison 1997). Enfin, on peut également citer l'exemple de la SWA2 α -amylase (*Schwanniomyces occidentalis* SWA2 alpha-amylase) étudiée sur *Saccharomyces cerevisiae* par Yanes et al. (Yanes, et al. 1998). Ils montrent que cette enzyme délétée de son seul site glycosylé ne voit pas sa sécrétion modifiée. Toutefois, l'activité catalytique des formes sécrétées est alors réduite d'un facteur 22.

Les expériences réalisées sur la chaîne B du PDGF (platelet-derived growth factor) par Kaetzel et al. ont mis en évidence un phénomène beaucoup plus surprenant. En effet, la suppression de la glycosylation sur la protéine par mutagenèse dirigée va entraîner une augmentation de la sécrétion du facteur de croissance sans perturber son activité mitogénique (Kaetzel, et al. 1996).

L'influence de la glycosylation peut également s'exercer sur la sécrétion des virus. Le cas du virus de l'hépatite B illustre bien ce phénomène. Par l'utilisation de divers inhibiteurs de la voie de glycosylation, il est possible de prévenir la sécrétion des particules virales (Lu, et al. 1995, Mehta, et al. 1998, Mehta, et al. 1997). Toutefois, ce sont les phases précoces de cette voie qui semblent être les étapes limitantes. La perturbation des phases tardives, qui ont lieu

dans l'appareil de Golgi, paraît n'influencer que faiblement la sécrétion (Lu, et al. 1995). Enfin, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, il semble que ce soit les perturbations de la glycosylation de la protéine M qui entraîne l'inhibition de la sécrétion du virus (Mehta, et al. 1997).

Tous ces exemples permettent de constater qu'il n'est pas possible d'établir une règle générale et que l'étendue de l'influence d'un glycanne sur une protéine donnée est difficilement prévisible. Toutefois, cette influence peut être déterminante sur le devenir de la protéine et du virus, et l'étude de la glycosylation est souvent nécessaire pour comprendre le fonctionnement de ces structures.

II.1.5.c. Implication de la glycosylation dans l'immunogénicité

Les oligosaccharides jouent un rôle clé dans l'immunogénicité d'un grand nombre de protéines. Ainsi, leur implication est maintenant bien connue dans des phénomènes tels que les processus inflammatoires et les rejets de greffes. De plus, des perturbations dans le processus de glycosylation sont connues pour être responsables de certains désordres auto-immuns (pour revue, voir (Delves 1998)).

La recherche concernant l'influence des glycanes sur l'immunogénicité d'une protéine a donné lieu à un très grand nombre de publications. On peut essayer de dégager de ces travaux deux phénomènes bien distincts qui illustrent la nature de la relation entre le glycanne et la protéine qui le porte.

→ Influence d'un glycanne sur un site antigénique

Ces glycanes peuvent exercer une influence négative sur l'activation des cellules T en gênant l'association entre le CMH et le peptide portant le site antigénique ou la reconnaissance par le TCR (T Cell Receptor) du complexe peptide-CMH (Harding, et al. 1991, Ishioka, et al. 1992, Michaelsson, et al. 1994, Thomas, et al. 1990). Certaines études concernant la gp120 du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou la protéine HA du virus de l'influenza, mettent en évidence ce phénomène. Botarelli et al. rapportent que 20% des clones de cellules T CD4 humaines, sensibilisés par une protéine gp120 non glycosylée, ne réagissent pas contre la même protéine native glycosylée (Botarelli, et al. 1991). Ils suggèrent que les glycanes présents sur la protéine native sont susceptibles de gêner la reconnaissance par les lymphocytes. Le même phénomène est décrit dans les études réalisées par l'équipe de Lorena Brown sur la protéine HA (Drummer, et al. 1993, Jackson, et al. 1994). L'attachement d'un glycanne sur la protéine HA

ou sur un peptide correspondant à une partie de la protéine entraîne une diminution de l'efficacité de la reconnaissance de la molécule par les lymphocytes T CD4.

L'influence de la glycosylation sur la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (T CD8+) a été étudiée par l'équipe de Walker (Doe, et al. 1994). Ils montrent que l'activité des CD8, vis à vis d'un épitope faisant partie de la région V3 de la protéine gp120 du VIH, est largement améliorée par une déglycosylation enzymatique de la protéine.

L'influence négative de la glycosylation peut également s'exercer sur la reconnaissance d'un épitope par les anticorps neutralisants. Plusieurs études réalisées sur la protéine gp120 montrent que l'introduction d'une chaîne glycanique localisée à proximité de la boucle V3 (Back, et al. 1994), de la région hypervariable (Davis, et al. 1990) et de la région définie par les aa 200 à 230 (Bolmstedt, et al. 1992) peut gêner l'accessibilité aux sites de neutralisation par les anticorps. Cette perturbation de la reconnaissance a été mise en évidence à de nombreuses reprises sur des protéines de différents types viraux: caprine arthrits-encephalitis virus (Huso, et al. 1988) et herpes simplex virus (Olofsson, et al. 1990, Sjoblom, et al. 1987) par exemple. Elle peut s'expliquer par une gêne stérique induite par la présence du glycanne, mais également par le fait que la présence de celui ci peut perturber la structure du peptide ou de la protéine (Otvos, et al. 1991) en favorisant la modification d'une structure hélicoïdale en une boucle β (Laczko, et al. 1992, Urge, et al. 1992).

Cette capacité du glycanne à masquer un site ou à entraîner une modification de la conformation de la protéine, permet de comprendre qu'il n'est pas vraiment paradoxal de constater que d'autres équipes rapportent un phénomène exactement inverse. C'est à dire que la présence de la glycosylation est indispensable pour qu'un site antigénique soit conservé.

Ainsi, en ce qui concerne la boucle V3 de la gp120 du VIH, Benjouad et al. montrent que l'intégrité de la glycosylation dans cette région doit être conservée pour que leurs anticorps neutralisants soit efficaces (Benjouad, et al. 1992). Il faut toutefois signaler que Back et al. (Back, et al. 1994) constatent que les virus mutants dont la protéine gp120 est déléetée du site de glycosylation Asn301, situé à proximité de la région V3, sont huit fois plus sensibles à la neutralisation que les virus sauvages. Plusieurs études montrent que la perturbation de la reconnaissance d'éventuels épitopes peut être entraînée par des modifications beaucoup plus fines du glycanne que sa simple suppression (Olofsson, et al. 1990, Sjoblom, et al. 1987). Ces auteurs rapportent que l'élimination d'un acide sialique ou d'un résidu galactose, situé en position terminale sur le glycanne complexe de la protéine gC-1 du HSV (herpes simplex virus), suffit à perturber gravement la reconnaissance par des anticorps de sites antigéniques situés à proximité. La présence d'une glycosylation supplémentaire peut aussi améliorer l'immunogénicité d'une

molécule. C'est ce que constatent Conrad et al. en ce qui concerne un peptide dérivé de la séquence de la gp46 de HTLVI (human T lymphocyte virus I) sur lequel est créé un site de glycosylation. En effet, l'immunogénicité de celui-ci est améliorée par rapport à la séquence sauvage (Conrad, et al. 1995).

La présence des glycannes peut aussi être nécessaire à la réponse des lymphocytes T CD4. Ainsi, Sjölander et al. rapportent que la déglycosylation de la protéine gp160 du VIH abolit la réponse T CD4 dirigée contre un épitope localisé à proximité des trois sites délétés, en position C-terminale (Sjolander, et al. 1996).

Toutes ces données mettent en évidence que l'influence exercée par la glycosylation va être étroitement liée à l'épitope étudié. La présence de celle-ci peut stabiliser une structure tridimensionnelle et donc une série d'épitopes, et son élimination peut bouleverser la conformation de la protéine et modifier considérablement les épitopes présentés au système immunitaire. Un épitope présent sur une protéine non glycosylée peut tout simplement ne pas exister sur la protéine glycosylée.

→ Le glycanne: un site antigénique à part entière ?

Il est apparu récemment que les glycannes pouvaient constituer des cibles privilégiées dans le cadre de traitement des cancers par immunothérapie. En effet, des phénomènes de glycosylation aberrante sont le trait le plus commun des cellules malignes et les réponses humorales des patients sont très souvent dirigées contre les structures glycaniques présentes à la surface de ces cellules (Hakomori 1989). Ces glycannes déclenchent une forte réponse humorale. Cette réponse a été exploitée thérapeutiquement dans le cadre de traitements de cancers des ovaires, du sein et colorectaux (Adluri, et al. 1995, Longenecker, et al. 1994, MacLean, et al. 1992). Les patients développent alors une forte réponse humorale de type IgM et IgG dirigée contre le déterminant glycanique mis en jeu, et bénéficient d'une survie prolongée proportionnée à l'intensité de la réponse (Longenecker, et al. 1994, MacLean, et al. 1993).

Plus généralement, les équipes s'étant attachées à l'étude biochimique des déterminants élués des molécules de CMHII, rapportent la présence de groupements glycaniques, probablement attachés aux peptides fixant le CMHII (Chicz, et al. 1994, Chiczy, et al. 1993). De même, de très nombreuses études destinées à déterminer l'immunogénicité de peptides, mimant des épitopes bien caractérisés de cellules T, et portant un glycanne en position centrale ou à leur extrémité (Deck, et al. 1995, Harding, et al. 1991, Haurum, et al. 1994, Haurum, et al. 1995,

Ishioka, et al. 1992, Michaelsson, et al. 1994, Mouritsen, et al. 1994, Otvos, et al. 1995) ont été réalisées. Elles montrent que ces peptides sont fortement immunogéniques et que le glycanne fait partie intégrante de l'épitope T. Le glycanne peut également constituer par lui même une cible efficace pour un anticorps neutralisant. C'est ce que montrent les études réalisées par Hansen et al. sur les glycannes portés par la protéine gp120 du VIH (Hansen, et al. 1990, Hansen, et al. 1991). L'infection par le VIH peut être bloquée par des anticorps neutralisants dirigés contre un déterminant antigénique porté exclusivement par le glycanne. Les travaux de Shiyam et al. sur la protéine AGP (α 1 acid glycoprotein), un constituant du sang humain, mettent en évidence un phénomène similaire (Shiyam and Bovin 1997). Ils montrent qu'en greffant les glycannes complexes de différentes glycoformes de la protéine AGP sur des matrices de polyacrylamide, on observe que l'immunogénicité de ces structures est très semblable à l'immunogénicité observée pour les protéines natives, et ceci vis à vis de plusieurs populations cellulaires (monocytes, granulocytes, lymphocytes). Ils suggèrent donc que c'est le glycanne qui détermine la modulation du système immunitaire et pas la protéine elle même.

Enfin, les travaux de l'équipe de Bahraoui sur la gp160 du VIH-I ont permis de révéler une propriété de ces glycannes qui semble très intéressante (Benjouad, et al. 1993, Benjouad, et al. 1992). Des anticorps neutralisants ont été produits chez le lapin contre une protéine gp160 de HIV-I, modifiée au niveau de ses glycannes par désialylation. Ces anticorps sont alors capables de fixer la gp160 de HIV-I mais aussi la gp140 de HIV-II. Cette cross réactivité permet d'envisager la possibilité d'une réponse immune spécifique d'un motif glycanne qui ne serait pas spécifique d'une seule souche virale. Toutefois, en l'occurrence, cette réactivité croisée n'est pas corrélée avec une neutralisation croisée.

Les propriétés antigéniques des glycannes qui viennent d'être résumées mettent bien en évidence leur intérêt dans des protocoles d'immunothérapie. Ils représentent une cible potentielle pour les anticorps neutralisants et peuvent porter des motifs qui déterminent une réactivité étendue à plusieurs souches virales, ce qui représente un espoir pour le développement d'un éventuel vaccin (voir p28). Leur étude est donc également fortement motivée par leur intérêt thérapeutique potentiel.

II.2. Résultats-discussion

Lorsque ce travail a été initié, peu d'informations sur les phénomènes de glycosylation de la protéine E1 du VHC étaient disponibles. Il a été montré, par analyse de la séquence en aa de la protéine E1 que celle ci porte cinq sites potentiels de glycosylation, pour la souche H. Les

analyses réalisées par Fournillier-Jacob *et al.* ont montré que seul, quatre des cinq sites étaient effectivement utilisés (Fournillier, et al. 1996).

Nous avons voulu dans notre travail déterminer les sites effectivement glycosylés sur E1 et le mécanisme déterminant l'absence de glycosylation sur le site non-glycosylé. Nous avons également tenté d'apporter des informations sur l'influence exercée par chacun de ces sites sur des phénomènes tels que le repliement de la protéine E1, la formation du complexe natif E1E2 et la sécrétion de la protéine E1.

Pour cela, nous avons construit une grande variété de mutants de glycosylation de E1 puis nous avons analysé le comportement de chacun des mutants.

Les résultats sont résumés dans la publication suivante

ARTICLE n°3

Analysis of the glycosylation sites of HCV glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of HCV glycoprotein complex

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

Jean-Christophe Meunier,¹ Anne Fournillier,² Amélie Choukhi,¹ Annie Cahour,³ Laurence Cocquerel,¹ Jean Dubuisson¹ and Czeslaw Wychowski¹

¹ CNRS-UMR 319, IBL/Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille CEDEX, France

² Unité INSERM U271, 151 Cours Albert Thomas, 69003 Lyon, France

³ CERVI (Virologie), Pitié-Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris CEDEX 13, France

The hepatitis C virus (HCV) genome encodes two membrane-associated envelope glycoproteins (E1 and E2), which are released from the viral polyprotein precursor by host signal peptidase cleavages. These glycoproteins interact to form a noncovalent heterodimeric complex, which is retained in the endoplasmic reticulum. HCV glycoproteins, E1 and E2, are heavily modified by *N*-linked glycosylation. A recent study has revealed that upon partial deglycosylation with endoglycosidase H only four of the five potential glycosylation sites of HCV glycoprotein E1 are utilized. In this work, the unused glycosylation site on the E1 glycoprotein was identified and the influence of *N*-linked glycosylation on the formation of the HCV glycoprotein complex was studied by expressing a panel of E1 glycosylation mutants in HepG2 cells. Each of the five potential *N*-linked glycosylation sites, located at amino acid positions 196, 209, 234, 305 and 325, respectively, on the HCV polyprotein, was mutated separately as well as in combination with the other sites. Expression of the mutated E1 proteins in HepG2 cells indicated that the fifth glycosylation site is not used for the addition of *N*-linked oligosaccharides and the Pro immediately following the sequon (Asn-Trp-Ser) precludes core glycosylation. The effect of each mutation on the formation of noncovalent E1E2 complexes was also analysed. As determined with the use of a conformation-sensitive monoclonal antibody, mutations at positions N2 and N3 had no, or only minor, effects on the assembly of the E1E2 complex, whereas a mutation at position N1 and predominantly at position N4 dramatically reduced the efficiency of the formation of noncovalent E1E2 complexes.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the major aetiological agent of human posttransfusion and community-acquired non-A, non-B hepatitis (Alter *et al.*, 1990; Choo *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1989), infecting probably 1% of the population worldwide (Houghton, 1996; Purcell, 1994). Infected individuals have a high risk of developing chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, making HCV a major cause of morbidity and mortality worldwide (Alter *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1990).

Comparative analyses of the genomes of several HCV strains that have been molecularly cloned and sequenced indicate that HCV is a member of the *Flaviviridae* family, which includes the flaviviruses and the pestiviruses (Miller & Purcell, 1990). HCV is a small, enveloped virus containing a positive-stranded linear RNA genome of approximately 9.5 kb. The RNA genome of HCV virus encodes a single polyprotein of 3010 to 3033 amino acids (Matsuura & Miyamura, 1993), which is processed co- and posttranslationally by the host cell as well as by virus-encoded proteases to create mature structural and nonstructural proteins. The HCV gene order has been determined as 5' C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B 3' (reviewed in Rice, 1996). The nonstructural proteins are processed by NS2 and NS3, the two viral proteases

Author for correspondence: Czeslaw Wychowski.

Fax +33 3 20 87 11 11. e-mail wychow@infobiogen.fr

(Bartenschlager *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993*a, b*; Hijikata *et al.*, 1993; Manabe *et al.*, 1994; Tomei *et al.*, 1993), whereas processing of the capsid protein and the two membrane-associated glycoproteins, E1 and E2, is mediated by host signal peptidase(s) (Grakoui *et al.*, 1993*c*; Hijikata *et al.*, 1991).

Expression of an HCV C-E1-E2 cDNA construct in a cell-free translation system (Hijikata *et al.*, 1991) or a cell culture system (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994; Fournillier-Jacob *et al.*, 1996; Grakoui *et al.*, 1993*c*; Kohara *et al.*, 1992; Matsuura *et al.*, 1992; Ralston *et al.*, 1993; Spaete *et al.*, 1992) showed that E1 and E2 glycoproteins are targeted to the endoplasmic reticulum (ER) by two independently functioning amino-terminal signal peptides, whereas the capsid protein remains in the cytoplasm (Santolini *et al.*, 1994). Following translocation, Asn-linked (*N*-linked) glycosylation of E1 and E2 takes place: HCV glycoproteins are highly glycosylated. Removal of *N*-linked carbohydrates from HCV glycoproteins with endoglycosidase H or prevention of glycosylation by expression in the presence of tunicamycin results in the loss of approximately half of the molecular mass of the HCV glycoproteins, as determined by SDS-PAGE (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996; Grakoui *et al.*, 1993*c*). E1 and E2 contain five (or six) and eleven potential *N*-linked glycosylation sites, respectively (reviewed in Rice, 1996). E2 glycoprotein seems to display a complex processing consistent with the generation of multiple E2 species (Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994) and forms a stable complex with E1, which is co-immunoprecipitable (Dubuisson *et al.*, 1994; Grakoui *et al.*, 1993*c*; Lanford *et al.*, 1993; Ralston *et al.*, 1993). Characterization of HCV glycoprotein complex formation using different expression systems indicates that a minority of these proteins are properly folded (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson & Rice, 1996). Properly folded E1 and E2 interact to form a heterodimer stabilized by noncovalent interactions (Deleersnyder *et al.*, 1997). Furthermore, the formation of the noncovalent E1E2 heterodimer is very slow, probably due to slow folding of these proteins (Deleersnyder *et al.*, 1997). It has also been shown that the formation of intramolecular disulfide bonds is slow for E1, whereas it is rapid for E2 (Dubuisson & Rice, 1996; Michalak *et al.*, 1997). In addition, E1 expressed in the absence of E2 does not fold properly, and it has been hypothesized that E2 may play a chaperone-like role in the folding of E1 (Michalak *et al.*, 1997).

N-linked glycosylation, which is one of the most common posttranslational modifications of proteins translocated in the ER, plays various roles in the folding, stability or biological activity of proteins (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Opdenakker *et al.*, 1993; Rademacher *et al.*, 1988). Animal viruses utilize the host cell glycosylation machinery to synthesize and process oligosaccharides attached to their glycoproteins. The core oligosaccharide chains are preassembled on a carrier lipid precursor in the ER and covalently attached to polypeptides at asparagine in the sequence Asn-X-Ser/Thr, required for *N*-linked glycosylation (Marshall, 1974), where X is any amino

acid except Pro (Gavel & von Heijne, 1990; Kornfeld & Kornfeld, 1985; Marshall, 1974). However, not every tripeptide sequence (or sequon) in a protein sequence is used for carbohydrate addition and indeed many sequons are inefficiently glycosylated (Shakin-Eshleman *et al.*, 1992) or remain unglycosylated (Gavel & von Heijne, 1990).

A recent study has revealed that one potential glycosylation site of HCV glycoprotein E1 (genotype 1a) is not utilized during the glycosylation process (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996). In the current study, we used oligonucleotide-directed mutagenesis of the E1 gene to construct a panel of E1 glycosylation mutants, firstly to identify which of the five potential *N*-linked glycosylation sites is not utilized during the glycosylation process and secondly to analyse the influence of E1 glycosylation on the formation of the HCV glycoprotein complex. Our data indicate that site 5 is not used for *N*-linked carbohydrate addition in the E1 glycoprotein and a defect in glycosylation at position 4 has a severe effect on the formation of noncovalent E1E2 complexes. Moreover, using a cell-free translation system, the core glycosylation efficiency at each functional sequon has been determined. While the sequons at positions 1, 2 and 3 are efficiently glycosylated, the sequon at position 4 is partially glycosylated.

Methods

■ **Cell cultures and viruses.** Cell lines (CV1, HepG2 and human 143 B thymidine kinase-deficient cells) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL) supplemented with 5% foetal calf serum and gentamycin (100 µg/ml). For expression studies, the CV-1 or HepG2 cells were cultured in 60 mm diameter culture dishes. The wild-type vaccinia virus Copenhagen strain and its thermosensitive *ts7* derivative (Drillien *et al.*, 1982) were amplified on HeLa cells, purified on sucrose gradients and titrated on CV1 cells. vTF7-3, a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase was obtained from B. Moss (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

■ **Site-directed mutagenesis.** The cDNA encoding HCV glycoprotein E1 was cloned into the replicative-form DNA of M13mp18 by using standard techniques in such a manner that the noncoding strand of the E1 cDNA of HCV was packaged into progeny M13 phages. Five synthetic oligonucleotide primers of 24 nucleotides in length were designed so that at each consensus sequence for *N*-linked glycosylation, Asn-X-Thr/Ser, a Gln-encoding codon was substituted for the Asn-encoding codon. Mutagenesis was carried out by the method originally described by Taylor *et al.* (1985) by using a commercially available *in vitro* mutagenesis kit provided by Amersham. Mutants are named with an N (for the Asn amino acid modification) and a number (related to the position of the glycosylation site on the map) (Fig. 1). Single-site glycosylation mutants were used to generate double- and triple-site mutants and so forth. In some conditions, E1 mutants were generated by ligating different enzyme restriction fragments containing the appropriate mutant sites. Cycle sequencing to verify the mutants was performed using the ABI Prism dye terminator ready reaction kit following the manufacturer's instructions (Perkin Elmer Vetus). The mutated fragments were excised from the bacteriophage replicative-form DNA with *EcoRI* and *BamHI* and ligated to pTMI/C^ΔE1₁₃₂₋₃₈₃ (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996) or pTMI/C^ΔE1E2p7₁₃₂₋₈₀₉. Recombinant DNA manipulations

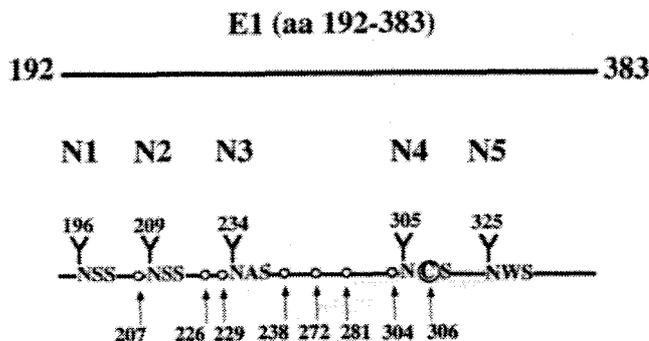


Fig. 1. Schematic representation of *N*-linked glycosylation sites in HCV glycoprotein E1. A linear diagram of the primary sequence of the E1 glycoprotein is shown. E1 is located between amino acids 192 and 383 on the HCV polyprotein. The E1 protein contains five potential *N*-linked glycosylation sites at residues 196, 209, 234, 305 and 325 as indicated by branched structures (Y). The mutants are named with an N (for the Asn amino acid modification) and a number, which is related to the position of the glycosylation site on the map (N1 to N5). The Cys residues are designated by small circles and the amino acid number of each Cys is shown below an arrow.

were made according to standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). Recombinant plasmids were controlled by sequencing.

■ **In vitro transcription and translation.** DNA from purified recombinant pTMI plasmids (2 µg) was used as template for *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (Promega). After a 60 min incubation at 37 °C followed by a 15 min RNase-free DNase RQ1 treatment (1 unit/µg), RNAs were extracted with phenol/chloroform (v/v) and ethanol-precipitated. Purified RNA transcripts were used at a concentration of 100 µg/ml for *in vitro* translation reactions using a rabbit reticulocyte lysate (15 µl) (Promega) supplemented with 15 µCi [³⁵S]methionine in the presence or absence of canine pancreatic microsomal membranes. After 60 min at 30 °C, samples were heated at 100 °C for 5 min in the presence of Laemmli buffer (Laemmli, 1970). Cell-free translation protein products were analysed by SDS-PAGE.

■ **Generation of recombinant vaccinia viruses.** Transfection and isolation of recombinant viruses were performed essentially as previously described (Kierny *et al.*, 1984).

■ **Antibodies.** Anti-HCV E1 (A4) and E2 (A11 and H2) MAbs have been described previously (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994) and were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Anti-calnexin antibodies (SPA-860) were supplied by Stress Gen.

■ **Metabolic labelling and immunoprecipitation.** HepG2 or CV1 cells were infected with vTF7-3 alone or in combination with another recombinant vaccinia virus, each at an m.o.i. of 5 p.f.u. per cell, and metabolically labelled with ³⁵S-protein labelling mix (NEN) as previously described (Dubuisson & Rice, 1996). Labelled infected cells were then lysed with 0.5% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 2 mM EDTA (TBS). For analyses under nonreducing conditions, the lysis buffer was supplemented with 20 mM iodoacetamide. Cell lysates were clarified by centrifugation in an Eppendorf centrifuge for 15 min.

Immunoprecipitations were carried out as described previously (Dubuisson & Rice, 1996). A 6 µl aliquot of rabbit anti-mouse IgG (Dako) was incubated with protein A-Sepharose (Pharmacia LKB) for 1 h at 4 °C in TBS containing 0.2% Triton X-100 (TBS-T). This step was omitted when polyclonal antibodies were used. The beads were then incubated

with 10 µl of MAb or polyclonal antibody, followed by the antigen (each step was performed for 1 h at 4 °C). Between each step, the beads were washed once with TBS-T. After the last step, they were washed three times with TBS-T and once with TBS. The immune complexes were boiled for 5 min in Laemmli buffer (Laemmli, 1970) (under nonreducing conditions, β-mercaptoethanol was omitted) before analysis by SDS-PAGE. After electrophoresis, the gels were treated with sodium salicylate (Chamberlain, 1979), dried and exposed at -70 °C to preflashed Hyperfilm-MP (Amersham). ¹⁴C-methylated protein molecular mass markers were purchased from Amersham.

Results

Identification of the functional *N*-linked glycosylation sites in E1

One of the five potential *N*-linked oligosaccharide acceptor sites of E1 is not utilized during glycosylation (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996). To identify the unused glycosylation site, mutant E1 proteins each lacking one of the glycosylation sites were obtained by site-directed mutagenesis.

Oligonucleotide-directed mutagenesis was employed to introduce two nucleotide changes in the codon encoding Asn, resulting in a single amino acid substitution at each potential glycosylation site. The addition of *N*-linked oligosaccharides was prevented by changing the Asn-X-Ser consensus sequence at Asn residues 196, 209, 234, 305 and 325 to Gln-X-Ser. The mutants in which the consensus sequence was altered are referred to as N1, N2, N3, N4 and N5. The positions are numbered sequentially from the N terminus of E1 (Fig. 1). The mutated cDNAs were reintroduced into the eukaryotic expression vector pTMI/C^ΔE1₁₉₂₋₃₈₃ (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996) or pTMI/C^ΔE1E2p₁₃₂₋₈₀₉, allowing expression of E1 or E1E2, respectively. In the first approach, the electrophoretic mobilities of the E1 mutants for a specific site of glycosylation (1, 2, 3, 4 or 5) were analysed in an *in vitro* transcription translation experiment and compared to the wild-type E1 expressed similarly *in vitro*. E1 glycoproteins with mutations at sites 1, 2, 3 or 4 (Fig. 2, E1 lanes N1 to N4 or E1E2 lanes N1

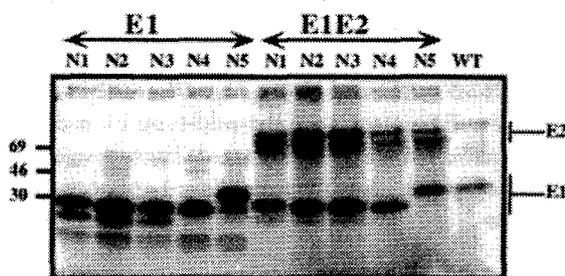


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of single E1 glycosylation mutants translated *in vitro*. T7 RNA transcripts obtained from DNA plasmids containing sequences encoding mutants E1 N1 to N5 and E1E2 N1 to N5, and for wild-type as control, were translated in a rabbit reticulocyte lysate in the presence of microsomal membranes, with the addition of [³⁵S]methionine in the reaction mixture. The location of wild-type E1 and E2 proteins is indicated on the right. Sizes (in kDa) of protein molecular mass markers are indicated on the left.

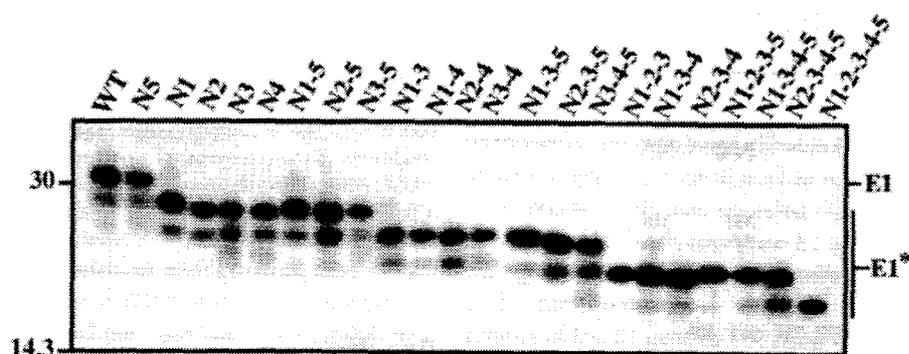


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of wild-type and glycosylation mutants of HCV E1. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing either wild-type E1E2 (WT) or the different mutants of E1 (within E1E2) at a multiplicity of 5 p.f.u. per cell. Infected cells were radiolabelled with [35 S]methionine for 2 h at 18 h post-infection. Proteins present in cell extracts were immunoprecipitated with MAb A4 (anti-E1) and separated by 12% SDS-PAGE and autoradiography. E1* represents the mutant E1 proteins altered in one, two, three or all glycosylation sites. The sizes of two 125 I-labelled marker polypeptides, carbonic anhydrase (30 kDa) and lysozyme (14.3 kDa), are indicated on the left.

to N4) migrated faster than the wild-type protein, indicating that these sites are used in the wild-type protein, while the protein with a mutation at site 5 (Fig. 2, E1 or E1E2 lanes N5) comigrated with the wild-type glycoprotein, suggesting that this site is not used for carbohydrate addition.

To confirm the above-mentioned conclusions, some mutant E1 proteins missing one or several glycosylation sites were made and analysed in *in vivo* infection experiments. The E1 mutants with several mutations were referred to as N1-5, N2-5, N1-3-5 and so forth (Fig. 3). All mutated cDNAs were introduced into pTM1/C $^{\Delta}$ E1E2p7₁₃₂₋₈₀₉ as mentioned above. Recombinant vaccinia viruses, expressing the different E1 mutants, were generated by homologous recombination (Kieny *et al.*, 1984). Mutated proteins expressed by recombinant vaccinia viruses were analysed by SDS-PAGE after immunoprecipitation with an anti-E1 MAb (A4) (Fig. 3). The wild-type E1 and the different E1 mutants expressed a protein with a molecular mass which ranged between 31 kDa and 19 kDa (wild-type E1 to N1-2-3-4-5 E1 protein). As expected, the electrophoretic mobility of the mutant E1 proteins increased proportionally with the number of inactivated glycosylation sites, with the exception of the mutant proteins containing the inactivated N5 site (Fig. 3, compare N1 and N1-5, N2 and N2-5 or N3 and N3-5). The difference in molecular mass between E1 mutants and the wild-type E1 is due to the number of carbohydrate chains attached. These results indicate that the potential glycosylation sites 1 to 4 are normally used, whereas site 5 (Asn-Trp-Ser-Pro-) is not glycosylated.

Absence of glycosylation at site 5 is due to the presence of a Pro residue downstream of the sequon

A dramatic impairment of glycosylation can be obtained with some glycoproteins. Indeed, no glycosyl transfer is detectable for peptides or proteins containing a Pro residue either in position X or in position Y of the Asn sequon (Asn-

X-Ser/Thr-Y) (Bause, 1983; Gavel & von Heijne, 1990; Kornfeld & Kornfeld, 1985; Marshall, 1974). In addition, recent studies have demonstrated that the presence of large hydrophobic amino acids (i.e. Trp, Leu or Phe) present at the X position of the sequon and leading to an unfavourable local protein conformation may inhibit core glycosylation (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996).

To confirm the involvement of amino acids Trp (W326) and Pro (P328) in the impairment of glycosylation site 5, these amino acids were changed by site-directed mutagenesis to Thr (T326) and Gly (G328), respectively. The amino acid Thr was selected according to Shakin-Eshleman *et al.* (1996), who reported that the presence of an amino acid with a hydroxy group such as Ser/Thr or Cys is associated with highly efficient core glycosylation. A single E1 mutant was constructed with a modification of the amino acid from Trp to Thr (W326 to T326) and a double E1 mutant with the modification of amino acids Trp to Thr (W326 to T326) and Pro to Gly (P328 to G328). The mutated cDNA sequences were introduced into pTM1/C $^{\Delta}$ E1E2₁₃₂₋₈₀₉ and recombinant vaccinia viruses were generated. The resulting mutants, named m1 and m2, correspond to the single and double mutants of E1, respectively (Fig. 4A). The mutated proteins expressed by recombinant vaccinia viruses were analysed by SDS-PAGE after immunoprecipitation with an anti-E1 MAb (A4) (Fig. 4B). The wild-type E1 and the m1E1 protein migrated as 31 kDa glycoproteins, while the m2E1 protein migrated as a 34 kDa glycoprotein, which corresponds to the addition of an N-linked oligosaccharide on amino acid Asn of the new sequon Asn-Thr-Ser-Gly. These results indicate that the replacement of amino acid W326 by T326 does not modify the profile of glycosylation of the m1E1 protein containing the sequon Asn-Thr-Ser-Pro. However, modification of P328 to G328 leads to the addition of an N-linked oligosaccharide on the Asn residue within the sequon Asn-Thr-Ser-Gly of the m2E1 protein. This analysis provides direct evidence that the presence of P328

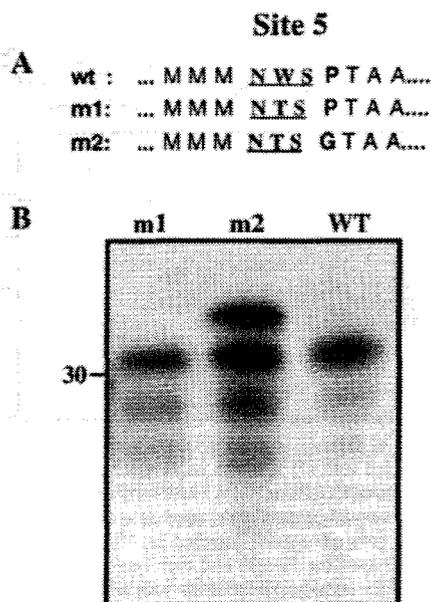


Fig. 4. Influence of the Pro residue in unglycosylated site 5. (A) The primary sequence in the region of unglycosylated site 5 and amino acid changes in the single mutant (m1) and double mutant (m2). The m1 mutant contains the modification of the amino acid Trp to Thr (W326 to T326) and the m2 mutant contains the modification of amino acids Trp to Thr (W326 to T326) and Pro to Gly (P328 to G328). (B) HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing either wild-type E1E2 (WT) or the m1 or m2 (within E1E2) at a multiplicity of 5 p.f.u. per cell. Infected cells were radiolabelled with [³⁵S]methionine for 2 h at 18 h post-infection. Proteins present in cell extracts were immunoprecipitated with MAb A4 (anti-E1) and separated by 12% SDS-PAGE and autoradiography. The size of the ¹⁴C-labelled marker polypeptide (carbonic anhydrase, 30 kDa) is indicated on the left.

immediately following the sequon Asn-Trp-Ser precludes core glycosylation at site 5.

Analysis of the role of E1 glycosylation on the formation of HCV glycoprotein complexes

In polyprotein maturation, one of the roles of glycans is to help in the folding of glycoproteins, either directly, by increasing the solubility of a protein, or indirectly, by interacting with ER chaperones like calnexin or calreticulin (Helenius, 1994). We were therefore interested in knowing whether or not mutations in the E1 glycosylation sites would alter E1 glycoprotein folding. Since there is no conformation-sensitive MAb available against E1, its folding was assessed indirectly with the help of a conformation-sensitive E2-specific MAb (H2), which has been shown, at least in the context of wild-type proteins, to specifically precipitate properly folded E1E2 heterodimers (Deleersnyder *et al.*, 1997).

Among the single mutants (N1 to N5), only the N4 mutation affected the coprecipitation of E1, as shown by immunoprecipitation with MAb H2 under reducing conditions (Fig. 5 A, compare lane N4 with lanes N1, N2 and N3). Mutation 5 on the E1 protein has no effect on the formation of E1E2 complexes and may be considered for the following

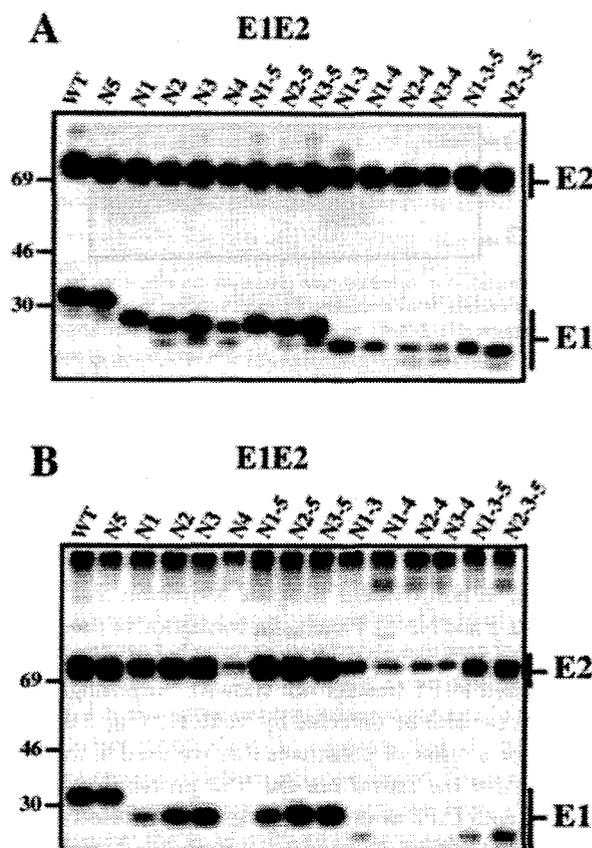


Fig. 5. Importance of E1 glycans on the formation of HCV glycoprotein complexes. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing either wild-type E1E2 (WT) or different mutants of E1 (within E1E2) at a multiplicity of 5 p.f.u. per cell. Infected cells were labelled with [³⁵S]methionine for 10 min and then incubated with the chase medium for 4 h. Cells were lysed in the presence of iodoacetamide (20 mM) to prevent further disulfide bond formation and the viral E1E2 complex was immunoprecipitated with MAb H2 and separated on SDS-PAGE under reducing (A) and nonreducing conditions (B). HCV-specific proteins are indicated on the right. Sizes (in kDa) of protein molecular mass markers are indicated on the left.

study as a control (Fig. 5 A, compare wild-type and N5, N2 and N2-5, and N3 and N3-5). In addition, as a general observation, the amount of E1 which coprecipitated with E2 was lower when the number of mutations in E1 increased (Fig. 5 A). In this study, one of the glycoproteins was mutated and, even if the domain bearing the H2 epitope in E2 was properly folded, we could not exclude the possibility of an alteration in the folding of another domain of E2 induced by the coexpression of the mutated form of E1. The immunoprecipitates were therefore analysed under nonreducing conditions to see whether or not the complexes formed between E2 and mutated E1 proteins were covalently linked. As shown in Fig. 5(B), it appears that E1 proteins lacking oligosaccharides at position 1 and predominantly at position 4, singly or in combination, reduced the formation of noncovalent complexes (Fig. 5B, N1 and N4, and compare N1-4, N2-4, N3-4 with N1-3-5, N2-3-5), whereas E1 lacking an oligosaccharide at position 2 or 3 had no

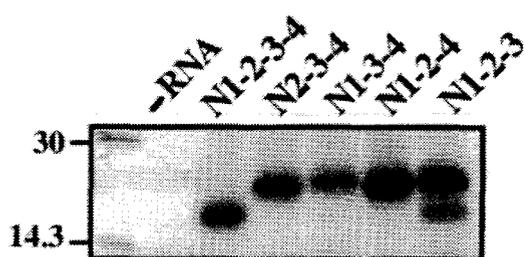


Fig. 6. Determination of *N*-linked core glycosylation efficiency for each sequon of E1 protein. RNA encoding E1 glycosylation mutants with no functional sequon (N1-2-3-4) or only one functional sequon at position 1, 2, 3 or 4 (respectively, N2-3-4, N1-3-4, N1-2-4 and N1-2-3) was prepared by *in vitro* transcription and translated in a rabbit reticulocyte lysate system containing [³⁵S]methionine in the presence of canine pancreatic microsomal membranes. A translational reaction including the canine pancreatic microsomal membranes but containing no exogenous RNA is also shown (lane -RNA). Translation products were analysed directly by SDS-PAGE and autoradiography. The positions of molecular mass markers are indicated on the left (in kDa).

impairment in noncovalent complex formation (Fig. 5 B, N2 and N3, N2-5 and N3-5). Finally, the formation of noncovalent complexes was abolished when several glycosylation sites were mutated in E1 (results not shown). Surprisingly, some aggregates can also be detected by MA b H2 (Fig. 5 B, lane 1). This may be a result of constructs that we used in this study. Indeed, neither the capsid nor the NS2 protein has been co-expressed with E1E2 as previously described (Deleersnyder *et al.*, 1997). Together, these data indicate that mutated E1 proteins interfere with the folding of E2, leading to misfolding of an E2 domain that aggregates with E1, while folding of the domain bearing the H2 epitope is not altered. These data also indicate that the formation of noncovalent E1E2 complexes can be impaired when some glycosylation sites are mutated in E1.

Determination of the efficiency of core glycosylation for each functional sequon of E1 protein

As a defect of glycosylation at position 1 and predominantly at position 4 of the E1 protein can reduce the formation of noncovalent E1E2 complexes, the core glycosylation efficiency at each of the four sequons was analysed.

A series of E1 glycosylation mutants containing only one functional sequon at each position described below was analysed using a cell-free translation system as described in Methods. Expression of E1 containing all mutated sequons produced a single major radiolabelled species with a molecular mass of 19 kDa (Fig. 6, lane N1-2-3-4), which represents the unglycosylated E1 protein. The E1 mutants containing a functional sequon at positions 1, 2 and 3 were efficiently glycosylated and produced a single major band with a molecular mass of 22 kDa (Fig. 6, lanes N2-3-4, N1-3-4 and N1-2-4), while the sequon at position 4 was glycosylated at a lower level and produced two radiolabelled products (19 kDa and 22 kDa proteins) (Fig. 6, lane N1-2-3). As determined by Phosphorimager analysis of the gels (not shown) only 66% of E1 was core glycosylated at position 4. When all these E1

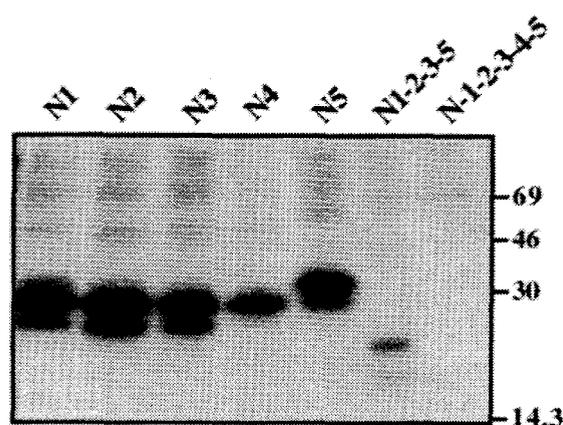


Fig. 7. Interaction of calnexin with E1 mutants lacking glycans. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing mutants of E1 (alone) at a multiplicity of 5 p.f.u. per cell. Mutant N5, containing all glycans, was used as a control. At 6 h post-infection, infected cells were pulse-labelled for 15 min with [³⁵S]methionine, chased for 10 min and then lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-calnexin antibodies. The anti-calnexin immune complexes were dissociated by heating for 5 min at 37 °C in 0.5% Nonidet P-40 and reprecipitated with MA b A4 (anti-E1). Immunoprecipitates were analysed by 12% SDS-PAGE under reducing conditions. The sizes (in kDa) of molecular mass markers are indicated on the right.

mutants were expressed in a cell-free translation system in the absence of canine pancreatic microsomal membranes, only one product, with a molecular mass of 22 kDa, corresponding to the uncleaved product C^NE1₁₃₂₋₃₈₃ was expressed. This result indicates that the unglycosylated form of E1 (N1-2-3) is not due to an untranslocated product (result not shown). As revealed *in vitro*, site 4 cannot be efficiently glycosylated and this may explain why some partial glycosylation forms of E1 are expressed *in vitro* and *in vivo*.

Analysis of the association of mutant E1 proteins with calnexin

Calnexin interacts with HCV glycoproteins (Dubuisson & Rice, 1996) and this chaperone has been shown to be involved in the assembly of the noncovalent E1E2 heterodimer (Choukhi *et al.*, 1998). The low level of noncovalent E1E2 complexes formed when E2 was coexpressed with some glycosylation mutants of E1 could therefore be due to an alteration in the interaction of E1 with calnexin. To evaluate this possibility, the interaction of this chaperone with some glycosylation mutants of E1 was investigated.

The ability of calnexin to interact with mutated E1 proteins was analysed by immunoprecipitation with an anti-calnexin antibody as previously described (Dubuisson & Rice, 1996). As shown in Fig. 7, the absence of one glycan at position N1, N2, N3 or N4 did not reduce the interaction between E1 and calnexin. This suggests that the lower level of noncovalent complex formation observed for mutants N1 and N4 (Fig. 6 B, lanes N1 and N4) is not due to an alteration in their interaction with calnexin. Furthermore, the ability of calnexin to interact

with E1 mutants exhibiting an increasing number of mutated glycosylation sites was evaluated. The interaction of E1 with calnexin was erased only with the E1 protein lacking all glycans, as shown in Fig. 7 (lane N1-2-3-4-5). However, the intensity of the bands coprecipitated with calnexin decreased with the number of glycans left on E1. In conclusion, it appears that the coprecipitation of mutant E1 proteins with calnexin is dependent on the number of glycans present on the proteins and this may account for the low level of proper folding of some mutant E1 proteins.

Discussion

The addition of *N*-linked oligosaccharides to specific Asn residues has been the subject of many investigations. It appears that this modification plays an important role in regulating the activity, stability or antigenicity of the mature protein (Opdenakker *et al.*, 1993; Rademacher *et al.*, 1988). It has also been suggested that *N*-linked glycosylation is required for folding, transport, cell surface expression, secretion of glycoproteins (Helenius, 1994), protection from proteolytic degradation and enhancement of glycoprotein solubility (Doms *et al.*, 1993; Rademacher *et al.*, 1988). Although the sequon is essential for core glycosylation, numerous examples of glycoproteins have been observed containing sequons which are either unglycosylated or glycosylated at a low level (Curling *et al.*, 1990; Pohl *et al.*, 1984). In this study, the glycosylation sites used in HCV glycoprotein E1 have been defined and the role of individual oligosaccharide chains in the formation of HCV glycoprotein complexes has been investigated.

Mutagenesis studies of E1 glycosylation sites indicate that site 5 in position 325 of the HCV polyprotein is non-glycosylated. While sequon Asn-X-Ser/Thr is absolutely required for the attachment of *N*-linked oligosaccharides to a glycoprotein (Marshall, 1974), its presence does not always result in glycosylation and some such sequons in glycoproteins can remain unglycosylated (Nakai & Kanehisa, 1988). Large hydrophobic amino acids (e.g. Trp, Leu, Phe and Tyr) (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996) or Pro (Bause, 1983; Gavel & von Heijne, 1990; Kornfeld & Kornfeld, 1985; Shakin-Eshleman *et al.*, 1996) present at position X of the sequon have been described as affecting core glycosylation by producing unfavourable local protein conformation, or blocking the accessibility of the oligosaccharyl transferase or the dolichol oligosaccharide donor to the sequon. Inhibition of core glycosylation can also be observed when a Pro is present at position Y of the sequon (Asn-X-Ser/Thr-Y) (Bause, 1983; Mellquist *et al.*, 1998). The unused glycosylation site 5 with the sequence Asn-Trp-Ser-Pro presents two unfavourable amino acids. Our results indicate that the modification of amino acid Trp to an amino acid with a hydroxy group, such as Thr, which is associated with highly efficient core glycosylation (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996), does not restore core glycosylation. However, when both Trp at position X and Pro at position Y were mutated,

attachment of a carbohydrate to glycosylation site 5 was observed. These data demonstrate that the inhibitory effect of Trp and Pro in the sequence Asn-Trp-Ser-Pro can be overcome by replacing them with Thr and Gly, respectively. However, the addition of a carbohydrate moiety to the glycosylation site is not blocked when Pro is located on the N-terminal side of the sequon, as shown by the glycosylation of site 2 of HCV glycoprotein E1 (Pro-Asn-Ser-Ser). These results confirm that glycosylation can be severely affected, depending on the position of Pro in the sequon (Bause, 1983).

A comparison of HCV nucleotide and amino acid sequences obtained from different parts of the world shows considerable diversity, and the existence of multiple HCV genotypes has been determined (Simmonds *et al.*, 1993). Analysis of the Japanese HCV strain BK has revealed six potential glycosylation sites (compared to the five of the prototype HCV-1) (Choo *et al.*, 1991), five of these sites being very conserved. Recent studies on the BK strain have shown that among the six potential sites, only five are glycosylated (De Martynoff *et al.*, 1997). The unused glycosylation site has not been localized for the BK strain but site 6, located at the same position as site 5 of HCV-1, has the same unfavourable sequence, Asn-Trp-Ser-Pro. This observation strongly suggests that site 6 of the BK strain is not recognized during glycosylation. The conservation among the glycosylation sites suggests that a selective pressure ensures the availability of these sites for carbohydrate attachment.

Inactivation of some functional glycosylation sites by site-directed mutagenesis reduces the formation of noncovalent HCV glycoprotein complexes and the severity of the defect depends on the location of the mutated glycosylated site. Mutation of glycosylation sites 2 and 3 of HCV E1 has no effect on the formation of noncovalent HCV glycoprotein complexes, in contrast to mutations at sites 1 and 4. The effect on noncovalent complex formation was more dramatic when site 4 was modified. It is likely that the presence of glycans at sites 1 and 4 is important for stabilizing the E1 structure or favouring its proper folding. The presence of a Cys residue at glycosylation site 4 in position X (Asn-Cys-Ser) suggests that the Cys cannot be involved in intramolecular disulfide bond formation if the site is glycosylated. However, in the absence of glycosylation, the Cys residue located at amino acid position 306 on the HCV polyprotein (Fig. 1) probably exhibits a free SH group that can interact with other proteins. In the context of coexpression with E2, an E1 protein mutated at position 4 may interact preferentially with E2. Indeed, folding of HCV glycoproteins involves the formation of intermediate E1E2 complexes and folding of E1 is thought to occur in these complexes (Choukhi *et al.*, 1998). The disulfide bridge potentially formed between the Cys present in site 4 and another Cys residue in E2 is probably very stable. Immunoprecipitation of aggregates by MAb H2 suggests that the N4 mutant is misfolded, causing the exposure of normally concealed Cys residues which then become available for disulphide bridging.

This may cause correctly folded E2 protein to become involved in aggregates. Sequon 1 does not contain any Cys residues, but mutating site 1 probably has some effect on the E1 folding which could result in disulfide bridge formation with a domain of E2. However, the effect on noncovalent E1E2 complex formation was less dramatic with the N1 mutant than with N4. HCV glycoprotein E1 lacking an oligosaccharide at position 2 or 3 had no impairment in noncovalent complex formation, indicating that the glycans present in these positions do not help in the folding and/or stability of the structure of E1. However, these glycans could play other roles, such as impeding recognition by neutralizing antibodies or protecting the glycoprotein from degradation in the extracellular environment. Due to the problems of replication in tissue culture, these potential functions cannot be studied for HCV.

Glycosylation mutants of E1 with a single modification did not show any impairment in their interaction with calnexin. Calnexin is an ER chaperone which binds selectively and transiently to newly synthesized glycoproteins (reviewed in Bergeron *et al.*, 1994) according to a mechanism based on a lectin-like affinity for monoglucosylated *N*-linked oligosaccharides (Hammond *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 1995; Ware *et al.*, 1995). It has been reported that calnexin interacts with newly synthesized HCV glycoproteins (Dubuisson & Rice, 1996) and more recent data show that this chaperone is involved in their folding (Choukhi *et al.*, 1998). However, since the glycosylation mutants N1 to N4 did not show any modification in their interaction with calnexin, the alteration of folding observed for some of them (N1 and N4) does not seem to involve calnexin. As discussed above, it may instead be due to exposure of free Cys residues. The amount of mutated E1 protein coprecipitated with calnexin depended on the number of glycans added to E1. Misfolding of the E1 protein with several mutations might therefore lead to a decrease in the E1 chaperoning activity of calnexin.

HCV glycoproteins are heavily glycosylated proteins. In this work, we have shown that some glycans present on E1 play a role in the folding and/or stability of the structure of E1. A similar approach will be necessary for a functional analysis of the glycans present on E2.

We thank André Pillez and Sophana Ung for excellent technical assistance. This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille and grant 1039 from the ARC. M.J.-C. was supported by a grant from the ARC and by Dominique Stehelin's Jeantet Prize.

References

- Alter, M. J., Hadler, S. C., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Moyer, L. A., Fields, H. A. & Bradley, D. W. (1990). Risk factors for acute non-A non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *Journal of the American Medical Association* **264**, 2231–2235.
- Alter, M. J., Margolis, H. S., Krawczynski, K., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Gerber, M. A., Sampliner, R. E., Meeks, E. L. & Beach, M. J. (1992). The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The sentinel counties chronic non-A, non-B hepatitis study team. *New England Journal of Medicine* **327**, 1899–1905.
- Bartenschlager, R., Ahlbornlaake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *Journal of Virology* **67**, 3835–3844.
- Bause, E. (1983). Structural requirements of *N*-glycosylation of proteins. *Biochemical Journal* **209**, 331–336.
- Bergeron, J. J., Brenner, M. B., Thomas, D. Y. & Williams, D. B. (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 124–128.
- Chamberlain, J. P. (1979). Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Analytical Biochemistry* **98**, 132–135.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.
- Choo, Q.-L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G. & Houghton, M. (1991). Genetic organisation and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**, 2451–2455.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998). Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **72**, 3851–3858.
- Curling, E. M., Hayter, P. M., Baines, A. J., Bull, A. T., Gull, K., Strange, P. G. & Jenkins, N. (1990). Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochemical Journal* **272**, 333–337.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697–704.
- De Martynoff, G., Venneman, A. & Maertens, G. (1997). Analysis of post-translational modifications of HCV structural proteins by using the vaccinia virus expression system. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Edited by M. Rizzetto, R. H. Purcell & H. Gerin. Turin: Minerva Medica.
- Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. R. & Helenius, A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**, 545–562.
- Drillien, R., Spehner, D. & Kirn, A. (1982). Complementation and genetic linkage between vaccinia virus temperature-sensitive mutants. *Virology* **68**, 372–381.
- Dubuisson, J. & Rice, C. M. (1996). Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of Virology* **70**, 778–786.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**, 6147–6160.
- Fournillier-Jacob, A., Cahour, A., Escriou, N., Girard, M. & Wychowski, C. (1996). Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *Journal of General Virology* **77**, 1055–1064.
- Gavel, Y. & von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Engineering* **3**, 433–442.
- Grakoui, A., Mccourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993a). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine

- proteinase – determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of Virology* **67**, 2832–2843.
- Grakoui, A., Mccourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993b). A second hepatitis-C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 10583–10587.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993c). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385–1395.
- Hammond, C., Braakman, I. & Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharides, glucose trimming and calnexin during glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 913–917.
- Hebert, D. N., Foellmer, B. & Helenius, A. (1995). Glucose trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425–433.
- Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* **5**, 253–265.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**, 5547–5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative non-structural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **67**, 4665–4675.
- Houghton, M. (1996). Hepatitis C viruses. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 1035–1058. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott–Raven.
- Kieny, M.-P., Lathe, R., Drillien, R., Spohner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H. & Lecocq, J.-P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**, 163–166.
- Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Maki, N., Asano, K., Yamaguchi, K., Miki, K., Tanaka, S., Hattori, N., Matsuura, Y., Saito, I., Miyamura, T. & Nomoto, A. (1992). Expression and characterization of glycoprotein gp35 of hepatitis C virus using recombinant vaccinia virus. *Journal of General Virology* **73**, 2313–2318.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 631–664.
- Kuo, G., Choo, Q.-L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redecker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stewens, C. E., Tegtmeier, G. E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J. R., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**, 362–364.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lanford, R. E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C. & Kim, J. (1993). Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* **197**, 225–235.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Mccourt, D. W. & Rice, C. M. (1994). Processing in the hepatitis C virus E2–NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology* **68**, 5063–5073.
- Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I. & Okayama, H. (1994). Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* **198**, 636–644.
- Marshall, R. D. (1974). The nature and metabolism of the carbohydrate–peptide linkages of glycoproteins. *Biochemical Society Symposia* **40**, 17–26.
- Matsuura, Y. & Miyamura, T. (1993). The molecular biology of hepatitis C virus. *Seminars in Virology* **4**, 297–304.
- Matsuura, Y., Harada, S., Suzuki, R., Watanabe, Y., Inoue, Y., Saito, I. & Miyamura, T. (1992). Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *Journal of Virology* **66**, 1425–1431.
- Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L. & Shakin-Eshleman, S. H. (1998). The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* **37**, 6833–6837.
- Michalak, J.-P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.-C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology* **78**, 2299–2306.
- Miller, R. H. & Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**, 2057–2061.
- Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S. I., Hirota, M., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1994). Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *Journal of Virology* **68**, 6215–6222.
- Nakai, K. & Kanehisa, M. (1988). Prediction of in vivo modification sites of proteins from their primary structures. *Journal of Biochemistry* **104**, 693–699.
- Opendakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P. & Dwek, R. A. (1993). Concepts and principles of glycobiology. *FASEB Journal* **7**, 1330–1337.
- Pohl, G., Kallstrom, M., Bergsdorf, N., Wallen, P. & Jornvall, H. (1984). Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry* **23**, 3701–3707.
- Purcell, R. H. (1994). Hepatitis C virus: historical perspective and current concepts. *FEMS Microbiology Review* **14**, 181–191.
- Rademacher, T. G., Parekh, R. B. & Dwek, R. A. (1988). Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry* **57**, 786–830.
- Ralston, R., Thudium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hall, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M. & Choo, Q. L. (1993). Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *Journal of Virology* **67**, 6753–6761.
- Rice, C. M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 931–959. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott–Raven.
- Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q. L., Houghton, M. & Kuo, G. (1990). Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**, 6547–6549.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & Lamonica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* **68**, 3631–3641.
- Shakin-Eshleman, S. H., Remaley, A. T., Eshleman, J. R., Wunner, W. H. & Spitalnik, S. L. (1992). N-linked glycosylation of rabies virus

glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 10690–10698.

Shakin-Eshleman, S. H., Spitalnik, S. L. & Kasturi, L. (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6363–6366.

Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T.-A., Chan, S.-W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J. & Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology* **74**, 2391–2399.

Spaete, R. R., Alexander, D., Rugroden, M. E., Choo, Q. L., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Leng, S., Lee, C., Ralston, R., Thudium, K., Tung, J. W., Kuo, G. & Houghton, M. (1992). Characterization of the hepatitis E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* **188**, 819–830.

Taylor, J. W., Ott, J. & Eckstein, F. (1985). The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Research* **13**, 8764–8785.

Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., Defrancesco, R. & Lamonica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *Journal of Virology* **67**, 4017–4026.

Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A. & Williams, D. B. (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 4697–4704.

Zhang, W. H., Liu, C. B., Sun, Y. D., Alter, H. J. & Shih, J. W. (1990). Hepatitis C virus causing non-A, non-B hepatitis in plasmapheresis center. *Lancet* **335**, 353.

Received 22 October 1998; Accepted 24 December 1998

II.2.1. Article n°3:

Analysis of the glycosylation sites of HCV glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of HCV glycoprotein complex

→ Identification des sites de glycosylation fonctionnels.

L'analyse des séquences en aa de la protéine E1 du VHC indique que cette glycoprotéine d'enveloppe possède cinq sites potentiels de glycosylation. Une cinétique de déglycosylation de la protéine E1 (souche H), par l'endo H, a révélé que 4 des 5 sites étaient glycosylés. Pour déterminer le site potentiel non glycosylé, le résidu Asn (N) de la triade N-X-S/T de chacun des sites a été substitué par un résidu Gln (Q). Cette modification abolit la glycosylation lorsqu'elle est fonctionnelle et reste sans effet lorsque le site n'est pas reconnu. Ainsi, les cinq sites potentiels notés N1 à N5, et dont les positions sur la polyprotéine du VHC sont respectivement 196, 209, 234, 305 et 325, ont été modifiés individuellement. Les séquences codantes pour chacune de ces protéines mutantes ont été insérées dans un vecteur d'expression eucaryote (pTM1). Les produits d'expressions ont été analysés, en premier lieu, par des méthodes de transcription-traduction in-vitro, en SDS-PAGE. L'étude des profils électrophorétiques de chacune des protéines mutées, comparés à celui de la protéine E1 sauvage, met en évidence qu'une mutation portée sur le site 5 ne modifie pas la migration de la protéine. A l'inverse, les protéines mutées en position N1, N2, N3 et N4 migrent plus rapidement que la protéine sauvage. Cela suggère que le site de glycosylation n°5 de la protéine E1 n'est pas fonctionnel (voir figure 2, article 3).

Pour confirmer ces résultats, des virus vaccine recombinants exprimant les protéines mutées sur un seul site ou plusieurs sites combinés ont alors été construits et les produits d'expression ont été analysés par séparation en SDS-PAGE après immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre E1 (A4). On peut observer figure 3 (article 3) que la mobilité électrophorétique de la protéine E1 est modifiée en proportion du nombre de sites de glycosylation inactivés, sauf en ce qui concerne le site 5. Ces résultats confirment que les sites 1 à 4 sont utilisés pour l'addition de glycanes, alors que le site 5 n'est pas glycosylé.

→ L'absence de glycosylation sur le site 5 est déterminée par la séquence en aa

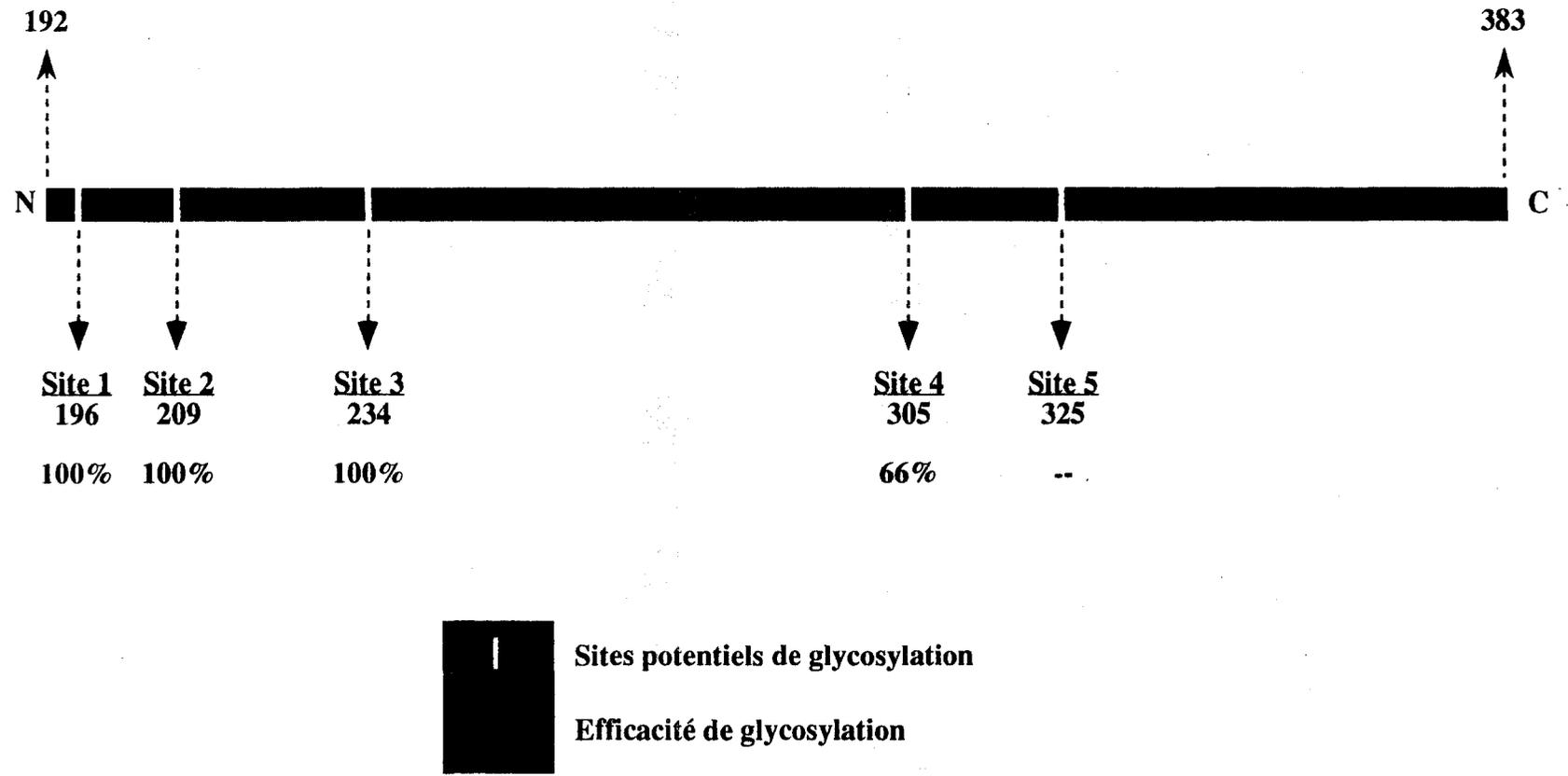


Figure 20 : Sites potentiels de glycosylation de la protéine E1 du VHC

Comme nous l'avons déjà exposé page 68, certains aa peuvent exercer une influence négative sur l'efficacité de glycosylation. L'étude de la séquence en aa du site de glycosylation n°5 nous montre que deux aa au contexte défavorable sont présents dans, ou à proximité immédiate de ce séquon. Ce sont les aa Trp et Pro, dont l'un est situé en position centrale du séquon (W326) et l'autre immédiatement après le séquon (P328) (voir figure 19). Pour confirmer l'implication de ces aa dans l'absence de glycosylation du site 5, plusieurs mutants de E1 ont été construits. Ces deux aa ont été remplacés par des aa plus favorables à la glycosylation, en accord avec les informations apportées par Shakin-Eshleman et al. (Shakin-Eshleman, et al. 1996). Nous avons donc construit un simple mutant (m1) en substituant le tryptophane (W326->T326), et un double mutant (m2) portant la même modification (W326->T326) plus une modification de la proline vers une glycine (P328->G328). Des virus vaccine recombinants exprimant ces protéines mutées ont alors été préparés et les produits d'expression étudiés dans des expériences de SDS-PAGE après immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre E1 (A4). Comme on peut l'observer figure 4 (article 3), la protéine E1 sauvage comigre avec le mutant m1E1, alors que la protéine m2E1 présente le profil de migration d'une protéine de 34 kDa. Ces résultats indiquent que le remplacement de la Thr326 par un Trp ne suffit pas à lever l'inhibition de la glycosylation sur le site 5, alors que les deux modifications W326->T326 et P328->G328 permettent de rétablir la glycosylation sur le site 5.

→ Analyse du rôle des glycanes de E1 dans la formation du complexe non-covalent E1E2

Nous avons donc voulu déterminer si les modifications apportées aux sites de glycosylation de E1 étaient de nature à influencer la formation du complexe natif E1E2. Pour cela, les produits d'expression des mutants de glycosylation, simples et combinés, ont été étudiés dans des expériences de SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices, après immunoprécipitation par un anticorps conformationnel dirigé contre E2 (H2). Comme nous pouvons le voir figure 5A (article 3), en conditions réductrices, parmi les simples mutants, seule une modification portée sur le site 4 altère la coprécipitation de la protéine E1. On remarque que la coprécipitation de E1 diminue proportionnellement avec le nombre de sites de glycosylation modifiés. Toutefois, ces modifications ne semblent pas perturber la précipitation de la protéine E2. En conditions non-réductrices (figure 5B, article 3), les protéines E1 et E2 visualisées ont pour origine un complexe E1E2 non-covalent (ou complexe natif). On remarque que les modifications apportées sur le site 1 et principalement sur le site 4 affectent la formation du complexe natif E1E2. En effet, la présence de la forme monomérique de E1 est très

diminuée et totalement supprimée pour respectivement, les mutants N1 et N4, et la présence de la forme monomérique de E2 est elle-même fortement diminuée en ce qui concerne le mutant N4. La modification d'un nombre croissant de sites perturbe de façon drastique la formation du complexe non-covalent, entraînant l'apparition de plus en plus importante d'agrégats. Dans ces conditions non-réductrices, on peut observer qu'une modification apportée sur la protéine E1 peut influencer la formation du complexe natif E1E2 mais également le repliement correct de la protéine E2. De plus, il semble que les sites 1 et 4 soient importants et qu'un défaut de glycosylation puisse être responsable de la formation de complexes aberrants

→ Détermination de l'efficacité de glycosylation pour chacun des sites de E1

Comme l'absence de glycosylation à certains sites de la protéine E1 pourrait expliquer la formation des agrégats, nous avons analysé l'efficacité de glycosylation pour chacun des séquons étudiés. Pour cela, une série de mutants de glycosylation contenant un seul site fonctionnel à chacune des positions 1, 2, 3 et 4 a été étudiée par transcription-traduction in-vitro. Comme on l'observe figure 6 (article 3), les protéines E1 mutées portant un seul site fonctionnel aux positions 1, 2 et 3 sont efficacement glycosylées (100%), et ne présentent qu'une seule bande de migration, d'une masse moléculaire apparente de 22 kDa. Le mutant de E1 portant un seul site fonctionnel en position 4 présente un profil de migration à deux bandes, une bande majeure indiquant la taille attendue de 22 kDa, et une bande de plus faible intensité correspondant à une protéine E1 complètement déglycosylée de 19 kDa et qui coïncide avec le profil de migration de la protéine E1 témoin déglycosylée. Les analyses quantitatives indiquent que la protéine E1 portant un seul site fonctionnel en position 4 n'est glycosylée qu'à environ 66 % (voir figure 20). Ce site semble donc présenter naturellement un défaut de glycosylation (in vitro).

→ Analyse de l'association des mutants de E1 avec la calnexine

Nous avons pu voir page 39 que la calnexine interagit avec les protéines E1 et E2, et est impliquée dans la formation du complexe natif E1E2 (voir figure 13). Nous avons voulu savoir si les perturbations observées sur la formation des complexes natif E1E2, lorsque la protéine E1 est mutée sur certains sites de glycosylation, pouvaient être dues à une diminution de l'interaction de ce chaperon avec la protéine E1 mutante. La capacité de la calnexine à interagir avec E1 a été étudiée par des techniques de co-immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé

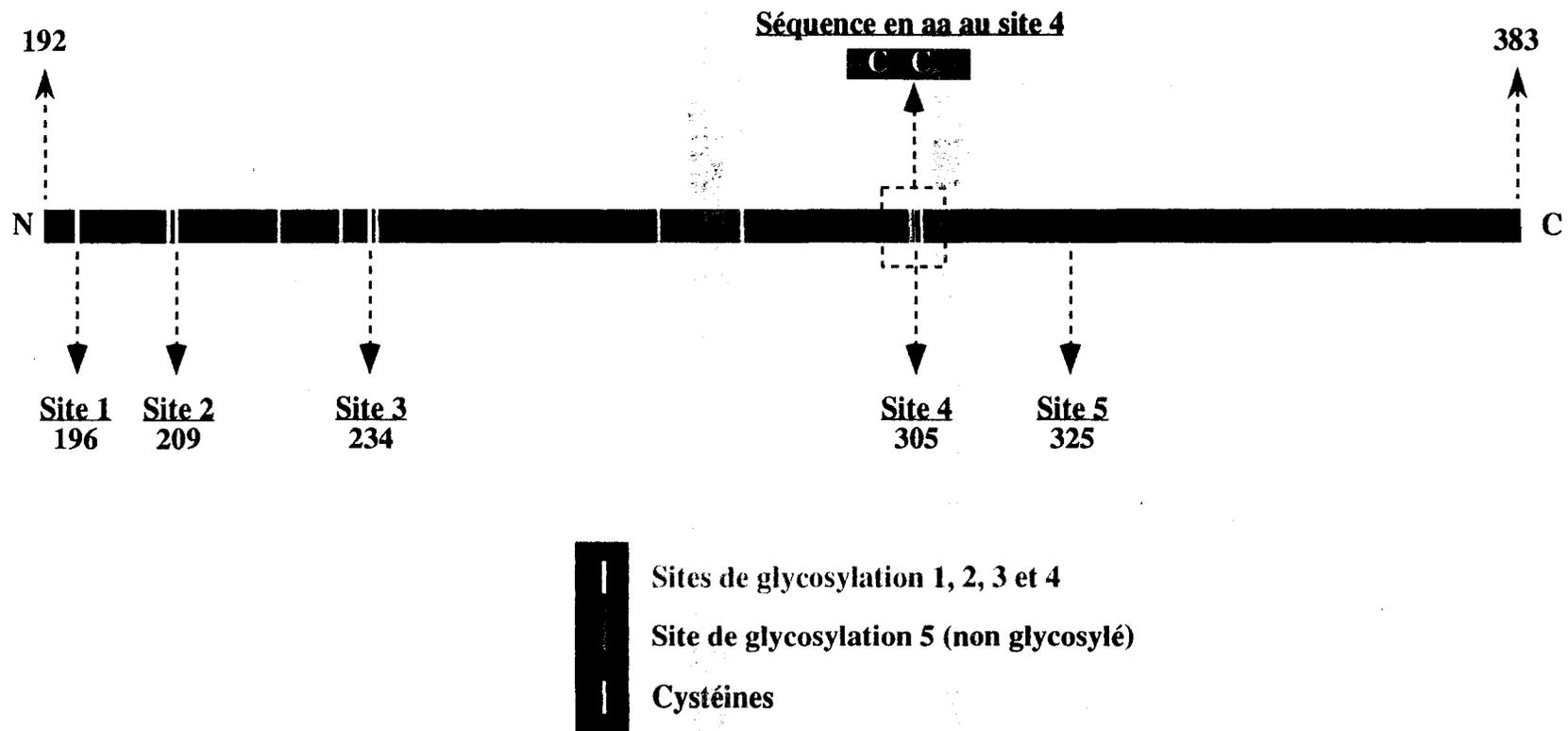


Figure 21 : Localisation des sites de glycosylation et des cystéines de la protéine E1 du VHC

Figure 22 : Les différentes protéines E1 du VHC, modifiées sur le site 4, par substitution des cystéines 304 et 306.

site N 4

Wt ...TTQSC **NCS** IYPG....
 304 306

Mutations dans le site N4

Site 4 mutant

DM ...TTQSC **QAS** IYPG....

GM ...TTQSA **QCS** IYPG....

2M ...TTQSA **QAS** IYPG....

Site 4 sauvage

DW ...TTQSC **NAS** IYPG....

GW ...TTQSA **NCS** IYPG....

2W ...TTQSA **NAS** IYPG....

contre la calnexine. Comme nous pouvons l'observer figure 7 (article 3), l'absence d'un site de glycosylation aux positions 1, 2, 3 ou 4 ne modifie pas notablement l'association de la protéine E1 avec la calnexine. Cela suggère que les perturbations qui ont été décrites précédemment n'impliquent pas un défaut d'association de ce chaperon avec les protéines E1 mutées. Nous avons également testé l'association de la calnexine avec des protéines E1 mutées sur un nombre croissant de sites de glycosylation. On constate que l'interaction de la calnexine avec la protéine E1 diminue en fonction du nombre de sites inactivés, et qu'elle est totalement abolie lorsque tous les sites de glycosylation sont absents. Il apparaît donc que la coprécipitation de la protéine E1 avec la calnexine dépend exclusivement du nombre de sites de glycosylation portés par la protéine E1.

→ Conclusions

Ces différents résultats permettent de formuler plusieurs commentaires:

En ce qui concerne le site cinq, on a démontré l'effet inhibiteur des aa Trp et Pro. On retrouve ici les phénomènes observés auparavant par plusieurs auteurs (voir page 68) sur d'autres systèmes d'études. On peut néanmoins constater que la proline en amont d'un site ne semble pas exercer l'effet inhibiteur qu'elle exerce en aval. Ainsi, le site de glycosylation n°2 de E1 qui est constitué par la séquence en aa Pro-Asn-Ser-Ser, présente pourtant une glycosylation efficace. L'influence de la proline sur l'efficacité de glycosylation dépend donc de sa position par rapport au séquen.

Les expériences évaluant l'efficacité de glycosylation à l'aide de traductions *in-vitro* montrent que le site n°1 est efficacement glycosylé. L'Asn de ce séquen est localisé à 5 aa de l'extrémité N-terminale de la protéine. Or, comme nous avons pu le voir page 67, plusieurs auteurs suggèrent que la proximité d'une des extrémités de la protéine défavorise la glycosylation. La glycosylation efficace du site 1 de la protéine E1 montre donc que ce facteur en lui même n'est pas suffisant pour empêcher la fixation du glycanne. Il serait probablement intéressant d'examiner les aa constituant les sites de glycosylation pris en compte dans ces études. Par ailleurs, on observe que lorsque ce site est muté, la formation du complexe natif E1E2 est perturbée. On peut suggérer que ce site se trouvant sur une des extrémités de la protéine, donc une zone de flexibilité plus importante que pour les sites se trouvant plus à l'intérieur (sites 2 et 3), sa capacité à influencer le repliement de cette région de la protéine s'en trouve accrue. Aussi, sa modification peut entraîner une perturbation amplifiée.

La mutation du site 4 entraîne une profonde altération de la formation du complexe E1E2. On peut suggérer que cette glycosylation, comme celle portée par le site 1 est nécessaire

pour stabiliser la protéine E1 et favoriser un repliement correct. Par ailleurs, lorsqu'on examine la séquence en aa dans cette région, on constate que deux cystéines sont présentes au niveau du site, l'une précédant l'Asn du séquen, l'autre faisant partie du sequon (voir figure 21). La position centrale de la cystéine 306 suggère que celle-ci n'est probablement pas impliquée dans un pont disulfure lorsque le site est glycosylé. Par contre, lorsque celui-ci est muté, cette cystéine pourrait intervenir dans la formation d'un pont disulfure. Dans le contexte de la co-expression avec E2, une protéine E1 mutée sur le site 4 pourrait interagir préférentiellement avec E2. En effet, comme nous l'avons vu page 36, le repliement des protéines E1 et E2 passe par la formation d'un complexe intermédiaire qui va favoriser le repliement de E1 (voir figure 16) (Choukhi, et al. 1998). Il est alors possible qu'un pont disulfure se forme entre la cystéine 306 de la protéine E1 et une cystéine de la protéine E2. Ceci peut expliquer que, lorsqu'on étudie la formation des complexes E1E2 natifs à l'aide de l'anticorps H2, en coexprimant E2 avec une protéine E1 mutée sur le site 4, on observe une diminution très importante de la quantité de complexes non-covalents E1E2. Par contre, la cystéine 304 n'interfère probablement pas avec le site, la liaison avec une autre cystéine ne pouvant s'effectuer qu'en amont du site, vers la partie N-terminale de la protéine. Toutefois, on peut remarquer que si la cystéine 306 est bloquée par la glycosylation du site 4, un nombre impair de cystéines sont susceptibles de réagir entre elles sur la protéine E1. Cela suggère qu'une cystéine demeure libre sur la protéine native, ce qui laisse supposer qu'il existe au maximum trois ponts disulfures sur la protéine E1.

Les mutants de glycosylation de E1 portant une seule modification s'associent efficacement avec le chaperon calnexine. La calnexine est impliquée dans le repliement des protéines E1 et E2 et donc, dans la formation du complexe natif E1E2 (voir page 39). Aussi, les perturbations observées dans la formation du complexe natif E1E2, lorsque la protéine E2 est coexprimée avec les mutants de glycosylations de E1 (N1 et N4), ne sont pas dues à une absence d'interaction de la protéine E1 avec le chaperon calnexine.

→ Expériences complémentaires

Nos expériences suggèrent donc que lorsque le site de glycosylation n°4 n'est pas glycosylé, la Cys 306 placée en position centrale pourrait être impliquée dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire (avec la protéine E2 par exemple). Nous avons montré également que le site de glycosylation n°4 est reconnu, il n'est glycosylé qu'avec une efficacité de 66%. Même dans la situation la plus favorable, la Cys 306 pourrait, dans un tiers des cas, former un pont disulfure avec une cystéine de la même protéine ou d'une autre protéine, menant à la formation d'agrégats et par conséquent, entrainer une diminution du nombre de complexes

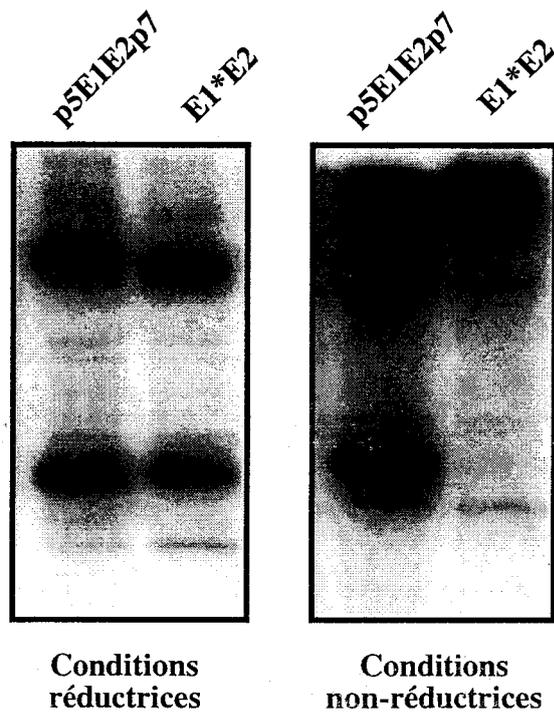


Figure 23 : Analyse en SDS-PAGE de la protéine E1 sauvage (p5E1E2p7) et de la protéine E1 dont les Ser en position 3 des sites de glycosylation 1, 2, 3 et 4 sont remplacés par une Thr (E1*E2). Les protéines sont exprimées en virus vaccine recombinant dans des conditions analogues à celles décrites dans la publication n°3. Les expériences sont réalisées en conditions réductrices et non-réductrices

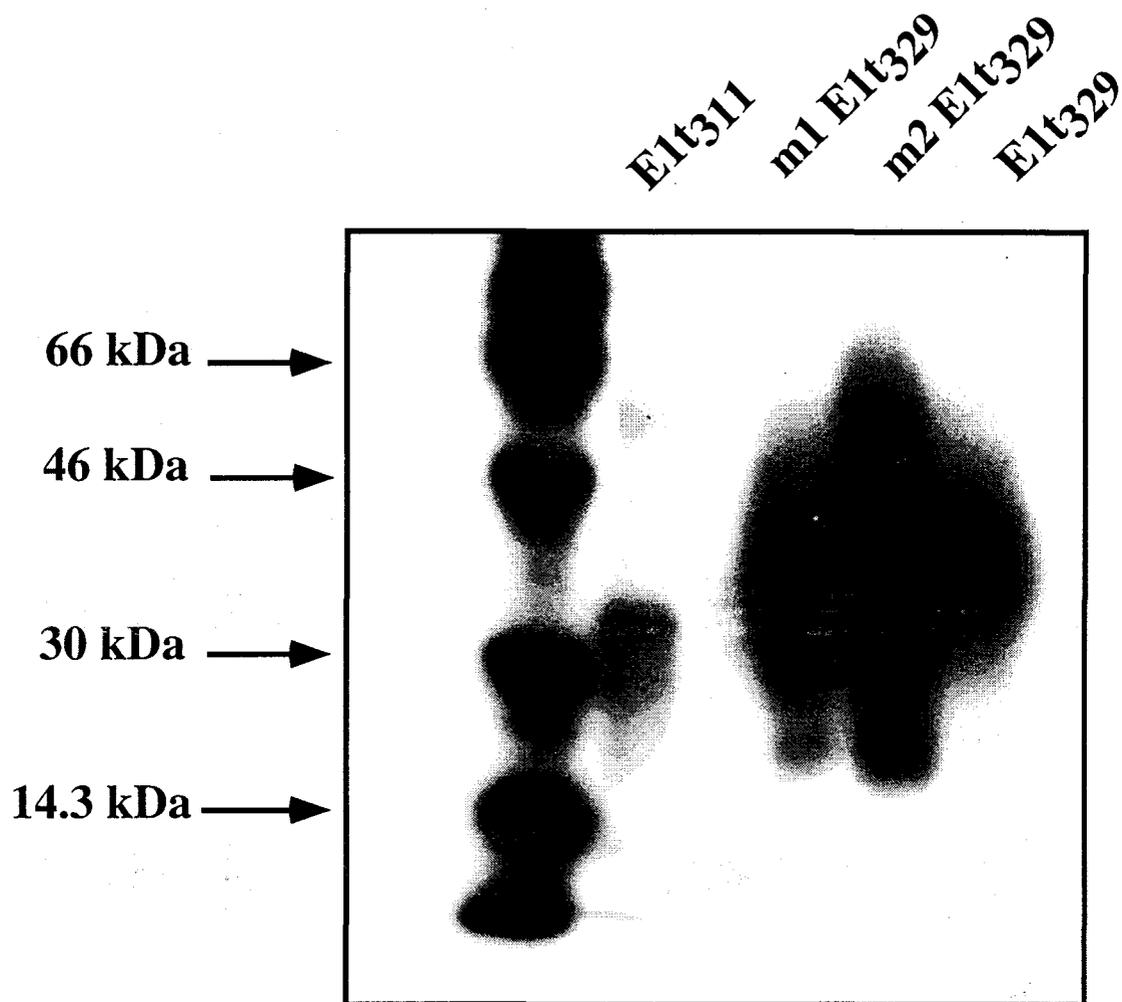


Figure 24 : Etude de la sécrétion des mutants de délétion $\Delta E1_{t329}$

Les produits d'expression des virus vaccine recombinants sont étudiés dans des expériences de marquage métabolique, suivi de chasse, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine E1 (A4), en condition réductrice. La migration est réalisée en SDS-PAGE.

non-covalents E1E2. Nous avons voulu savoir si la substitution de la Cys 306 de la protéine E1 était susceptible d'entraîner une diminution de la formation des agrégats et donc, favoriser la formation des complexes E1E2 non-covalents. Nous avons également étudié le comportement de la protéine E1 lorsque la Cys 304 était substituée. En effet, nous avons suggéré que ce résidu pouvait être la deuxième cystéine à ne pas être impliquée dans un pont disulfure, lorsque la protéine est glycosylée, en raison de l'encombrement stérique que pourrait provoquer le glycanne. Nous avons pour cela, réalisé plusieurs mutants de E1 où ces deux cystéines étaient remplacées par une alanine, alternativement ou ensemble, et ceci dans le contexte d'une protéine E1 mutée ou non sur le site de glycosylation n°4 (voir figure 22). Des virus vaccine recombinants exprimant ces protéines mutées ont été construits et leurs produits d'expression étudiés, à l'aide de l'anticorps H2, dans des expériences de marquage métabolique suivi de chasse. Les expériences ont été réalisées en milieu réducteur et non-réducteur.

En milieu réducteur, on peut constater que les protéines sont correctement exprimées et le profil de migration correspond à un poids moléculaire apparent attendu. En milieu non-réducteur, toutes les protéines exprimées sont retrouvées sous la forme d'agrégats. On ne visualise plus la forme monomérique de la protéine E1. Cela montre que la modification de l'une ou l'autre des cystéines 304 et 306 entraîne une profonde déstabilisation de la protéine E1. Ces deux cystéines ont donc une influence déterminante sur le repliement correct de E1. Ainsi, bien que la cystéine 306 ne semble pas pouvoir, dans la majorité des cas, participer à la formation d'un pont disulfure, elle pourrait néanmoins être fortement impliquée dans une structure nécessaire au repliement de la protéine E1. L'analyse des séquences des différentes souches du VHC montrent par ailleurs, que cette cystéine est toujours conservée. Son importance est probablement déterminante. Ces expériences ne permettent donc pas de statuer sur l'implication de ces cystéines dans la formation des ponts disulfures menant éventuellement à la formation d'agrégats. En effet, le remplacement de ces cystéines entraîne l'inhibition de la formation des protéines E1 correctement repliées, supprimant ainsi toute possibilité d'observation. Aussi, il nous a fallu utiliser une autre stratégie afin de comprendre les interrelations entre la glycosylation sur le site 4 et la cystéine 306, et la répercussion de ce phénomène sur la formation du complexe natif E1E2.

Notre stratégie a consisté à s'intéresser au troisième aa des séquons de E1. On peut constater en effet que tous les sites de glycosylation de la protéine E1 du VHC sont composés d'une séquence d'aa comprenant une sérine en position 3. Comme nous avons pu le voir page 68, une sérine en position 3 est liée à une efficacité de glycosylation deux à trois fois inférieure à celle d'une thréonine à la même position. Nous avons donc voulu savoir si le remplacement des sérines en position 3 par des thréonines, était susceptible d'exercer une influence positive sur le

repliement correct de la protéine E1 et la formation du complexe E1E2. Il faut noter que ces expériences ont été entreprises avant qu'on ne détermine l'efficacité de glycosylation sur chacun des sites de la protéine E1. Tout d'abord, on peut supposer que cette substitution pourrait favoriser une glycosylation efficace sur le site 4, empêchant ainsi la cystéine en position 2 du séquen de réagir avec une autre cystéine, ce qui est supposé mener à la formation d'agrégats. D'autre part, il est également envisageable qu'une protéine possédant tous ses sites dans la configuration la plus favorable à une glycosylation efficace, aura d'autant plus de chance de se replier correctement. En effet, comme nous l'avons exposé page 71, le repliement correct de nombreuses glycoprotéines est dépendant de la présence des glycannes. Aussi, nous avons construit une protéine E1 pour laquelle toutes les sérines en position 3 des sites de glycosylation ont été remplacées par des thréonines. Cette protéine a été exprimée, dans le contexte E1E2, à l'aide de virus vaccine recombinants. Les produits d'expression ont été étudiés dans des expériences de marquage métabolique suivi de chasse à l'aide de l'anticorps H2. Les expériences ont été réalisées en milieu réducteur et en milieu non-réducteur.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 23. En milieu réducteur, on peut constater que le profil de migration de la protéine E1 corespond à un poids moléculaire apparent attendu. En milieu non-réducteur, la protéine E1 est retrouvée sous la forme d'agrégats dans le haut du gel. On ne détecte plus de protéine E1 coprécipitée avec la protéine E2.

Ces résultats sont quelque peu surprenants, mais on peut néanmoins proposer une explication. Nous avons envisagé que le remplacement des sérines en position trois du site 4 par des thréonines serait lié, au pire, à une absence de modification du comportement de E1 et au mieux, à une amélioration conséquente du repliement de E1, et en conséquence, à une augmentation de l'efficacité de formation des complexes E1E2 natifs. Ici, il semble que les modifications apportées sur E1 déstabilisent fortement la protéine. Il est probable que le simple fait de modifier quatre acides aminés composant la protéine ait entraîné une perturbation des processus de repliements, entraînant la formation de protéines mal repliées.

Les expériences de traduction *in-vitro* permettant d'évaluer l'efficacité de glycosylation sur chaque site de glycosylation de la protéine E1, ont montré qu'en dehors du site 4, glycosylé à environ 60%, les autres sites étaient parfaitement glycosylés. Les sites 1, 2 et 3 ne nécessitent donc pas de modifications permettant d'améliorer leur glycosylation. Nous allons donc exprimer une protéine E1, pour laquelle seule la sérine en position 3 du séquen n°4 sera modifiée en thréonine. Nous espérons que l'amélioration de l'efficacité de glycosylation sur le site 4 permettra de favoriser la formation des complexes non-covalents E1E2.

Comme cela est exposé dans l'article n°3, une série de mutants de la protéine E1, modifiés au niveau du site 5, ont été construits afin de déterminer l'implication de la séquence en acides aminés du séquen sur l'efficacité de sa glycosylation. Nous avons montré que lorsque la double modification Trp→Thr (W326→T326) et Pro→Gly (P328→G328) est effectuée, le site de glycosylation n°5 est glycosylé. Nous avons alors voulu déterminer l'influence de cette glycosylation supplémentaire une forme de la protéine E1 apte à être sécrétée. En effet, nous avons vu page 72 que les glycanes pouvaient influencer fortement la sécrétion d'une protéine. Aussi, nous avons construit un mutant de E1, délété de sa partie C-terminale, jusqu'à l'aa 329 ($\Delta E1_{1-329}$). Trois formes de ce mutant ont été réalisées: une protéine $\Delta E1_{1-329}$ portant la séquence de E1 native (wt $\Delta E1_{1-329}$), une protéine $\Delta E1_{1-329}$ portant la modification Trp→Thr (W326→T326) (m1 $\Delta E1_{1-329}$) et une protéine portant la double modification Trp→Thr (W326→T326) et Pro→Gly (P328→G328) (m2 $\Delta E1_{1-329}$). Des virus vaccine recombinants exprimant ces protéines mutées ont été construits et les produits d'expression étudiés dans des expériences de marquage métabolique suivi de chasse à l'aide de plusieurs anticorps dirigés contre E1, un anticorps monoclonal (A4) et un anticorps polyclonal. Les expériences ont été réalisées en milieu réducteur et en milieu non-réducteur. Les immunoprécipitations ont été réalisées sur les lysats cellulaires et sur les surnageants de culture.

Comme nous pouvons le voir figure 24, réalisée en milieu réducteur à l'aide de l'anticorps A4, toutes les protéines E1 mutées sont efficacement sécrétées. Toutefois, il ne semble pas y avoir de différences décelables entre les sécrétions des trois constructions que nous venons de décrire. En revanche, nous pouvons remarquer que le taux de sécrétion de ces trois constructions est bien supérieur à celui d'une protéine E1 témoin, délétée jusqu'à l'acide aminé 311 ($\Delta E1_{1-311}$) (Michalak, et al. 1997). Les expériences réalisées en milieu réducteur et non-réducteur à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre E1, montrent qu'on retrouve dans le surnageant des formes de E1 sous forme monomérique. Il faut remarquer ici que la protéine $\Delta E1_{1-329}$ est plus longue de 18 aa que la protéine $\Delta E1_{1-311}$. La sécrétion de la protéine $\Delta E1_{1-329}$ étant bien plus efficace que celle de la protéine $\Delta E1_{1-311}$ (dans les conditions indiquées figure 23), on peut suggérer que la séquence supplémentaire intervient en stabilisant la protéine. De même, il faut signaler que le site 5, compris dans ces 18 aa, pourtant non-glycosylé est très conservé à travers les génotypes.

II.2.2. Conclusions-Perspectives

Nous avons montré que le site de glycosylation n°4 était un élément déterminant pour la formation d'un complexe E1E2 natif. De plus, les expériences réalisées sur les protéines E1

modifiées au niveau de la cystéine 306 suggèrent que ce résidu joue un rôle important lors du repliement de cette protéine. En effet, sa substitution entraîne, en conditions non-réductrices, la disparition de la forme monomérique de E1, et la formation d'agrégats. Or, l'alanine est l'aa le plus couramment utilisé pour remplacer une cystéine, leurs caractéristique structurales étant relativement proches. Ce résidu cystéine 306 étant de plus très conservé à travers les géotypes, il est probable que sa présence soit indispensable pour que la protéine E1 puisse se replier correctement, bien qu'il ne semble pas pouvoir participer à la formation des ponts disulfures intramoléculaires de la protéine E1 native. Afin de déterminer l'implication de cette cystéine 306 dans la formation des agrégats, nous allons tenter d'améliorer l'efficacité de glycosylation sur le site 4, en limitant ainsi la capacité de ce résidu à participer à la formation d'un pont disulfure inopportun. Une augmentation de la quantité des complexes E1E2 correctement repliés suggérerait donc que cette cystéine est impliquée directement dans la formation des agrégats. Nous avons en premier lieu substitué les résidus sérines des séquons 1, 2, 3 et 4 de la protéine par des résidus thréonines. Comme nous l'avons vu, ces substitutions mènent également à la formation agrégats. Aussi, la substitution du résidu sérine du seul site de glycosylation n°4 sera entreprise.

Par ailleurs, nous avons montré que la protéine E1 tronquée $\Delta E1_{1329}$ était très efficacement sécrétée. Toutefois, les expériences d'immunoprécipitation réalisées à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre E1, en condition non-réductrice, ont montré que la forme monomérique de la protéine E1 n'était pas la forme majoritairement précipitée, mais qu'on retrouvait plutôt une grande quantité d'agrégats dans le surnageant. Nous tenterons donc de favoriser la sécrétion de formes monomériques de la protéine E1 en substituant la sérine du site de glycosylation n°4 par une thréonine. Une grande quantité de formes monomériques de la protéine E1 sécrétée dans le surnageant serait un outil de choix pour élucider ses fonctions biologiques. Ces formes monomériques pourraient être utilisées pour déterminer la nature des ponts disulfures internes de E1 et éventuellement sa structure tridimensionnelle. Enfin, des protéines fortement sécrétées seraient très utiles pour constituer un outil diagnostique.

BIBLIOGRAPHIE

-
- Adluri, S., F. Helling, S. Ogata, S. Zhang, S. H. Itzkowitz, K. O. Lloyd, and P. O. Livingston. 1995. Immunogenicity of synthetic TF-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) and sTn-KLH conjugates in colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **41**:185-192.
 - Allen, S., H. Y. Naim, and N. J. Bulleid. 1995. Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J Biol Chem.* **270**:4797-804.
 - Alter, H. J., R. H. Purcell, P. V. Holland, and H. Popper. 1978. Transmissible non-A, non-B hepatitis. *The Lancet.* **1**:459-463.
 - Amoroso, P., M. Rapicetta, M. E. Tosti, A. Mele, E. Spada, S. Buonocore, G. Lettieri, P. Pierri, P. Chionne, A. R. Ciccaglione, and L. Sagliocca. 1998. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C [In Process Citation]. *J Hepatol.* **28**:939-44.
 - Andersson, A. M., L. Melin, A. Bean, and R. F. Pettersson. 1997. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a Bunyaviridae (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J Virol.* **71**:4717-27.
 - Ardail, D., O. Gateau, R. Morelis, and P. Louisot. 1985. Glycosyltransferase activities in liver mitochondria. Phospholipid- dependence of inner membrane mannosyltransferase. *Eur J Biochem.* **149**:497-502.
 - Aridor, M., S. I. Bannykh, T. Rowe, and W. E. Balch. 1995. Sequential coupling between COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to golgi transport. *J. Cell Biol.* **131**:875-893.
 - Armstrong, J., and S. Patel. 1991. The Golgi sorting domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Sci*:567-75.
 - Asabe, S. I., Y. Tanji, S. Satoh, T. Kaneko, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1997. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol.* **71**:790-796.
 - Asada, M., K. Furukawa, K. Segawa, T. Endo, and A. Kobata. 1997. Increased expression of highly branched N-glycans at cell surface is correlated with the malignant phenotypes of mouse tumor cells. *Cancer Res.* **57**:1073-80.
 - Back, N. K., L. Smit, J. J. De, W. Keulen, M. Schutten, J. Goudsmit, and M. Tersmette. 1994. An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology.* **199**:431-8.
 - Bang, B. K., C. W. Yang, S. A. Yoon, Y. S. Kim, Y. S. Chang, Y. S. Yoon, and Y. B. Koh. 1995. Prevalence and clinical course of hepatitis B and hepatitis C liver disease in ciclosporin-treated renal allograft recipients. *Nephron.* **70**:397-401.

-
- Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:1200-5.
 - Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* **77**:895-907.
 - Bartenschlager, R., L. Ahlbornlaake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol.* **68**:5045-5055.
 - Bartenschlager, R., L. Ahlbornlaake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1993. Nonstructural Protein-3 of the Hepatitis-C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions. *J Virol.* **67**:3835-3844.
 - Basaras, M., N. Lombera, B. De Las Heras, C. Lopez, E. Arrese, and R. Cisterna. 1997. Distribution of HCV genotypes in patients infected by different sources. *Res Virol.* **148**:367-73.
 - Baudin, B., N. Alves, A. Pilon, B. B. Beneteau, and J. Giboudeau. 1997. Structural and biological roles of glycosylations in pulmonary angiotensin I-converting enzyme. *Glycobiology.* **7**:565-70.
 - Bause, E. 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* **209**:331-336.
 - Bause, E., and H. Hettkamp. 1979. Primary structural requirements for N-glycosylation of peptides in rat liver. *FEBS Lett.* **108**:341-344.
 - Bause, E., H. Hettkamp, and G. Legler. 1982. Conformational aspects of N-glycosylation of proteins. Studies with linear and cyclic peptides as probes. *Biochem. J.* **203**:761-768.
 - Bause, E., and G. Legler. 1981. The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *Biochem. J.* **195**:639-644.
 - Bednarek, S. Y., M. Ravazzola, M. Hosobuchi, M. Amherdt, and A. Perrelet. 1995. COP I- and COP II-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell.* **83**:1183-96.
 - Beeley, J. G. 1985. Glycoprotein and proteoglycan Techniques. *In Elsevier* (ed.).
 - Benani, A., T. J. El, S. Benjelloun, S. Sekkat, S. Nadifi, N. Hda, and A. Benslimane. 1997. HCV genotypes in Morocco. *J Med Virol.* **52**:396-8.
 - Benjouad, A., J. C. Gluckman, L. Montagnier, and E. Bahraoui. 1993. Specificity of antibodies produced against native or desialylated human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160. *J Virol.* **67**:1693-7.
 - Benjouad, A., J. C. Gluckman, H. Rochat, L. Montagnier, and E. Bahraoui. 1992. Influence of carbohydrate moieties on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160. *J Virol.* **66**:2473-83.
 - Bergeron, J. J. M., M. B. Brenner, D. Y. Thomas, and D. B. Williams. 1994. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **19**:124-129.

- **Beyer, T. A., J. E. Sadler, J. I. Rearick, J. C. Paulson, and R. L. Hill.** 1981. Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **52**:23-175.
- **Blight, K. J., and C. M. Rice.** 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol.* **71**:7345-52.
- **Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Vinish.** 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *Journal of American Medical Association.* **191**:541-546.
- **Bode, J. C., D. M. Alschler, H. Wisser, and C. Bode.** 1995. Detection of hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus RNA in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.* **30**:97-103.
- **Bolmstedt, A., S. Olofsson, J. E. Sjogren, S. Jeansson, I. Sjoblom, L. Akerblom, J. E. Hansen, and S. L. Hu.** 1992. Carbohydrate determinant NeuAc-Gal beta (1-4) of N-linked glycans modulates the antigenic activity of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Gen Virol*:3099-105.
- **Bonen, D. K., F. Nassir, A. M. Hausman, and N. O. Davidson.** 1998. Inhibition of N-linked glycosylation results in retention of intracellular apo[a] in hepatoma cells, although nonglycosylated and immature forms of apolipoprotein[a] are competent to associate with apolipoprotein B-100 in vitro [In Process Citation]. *J Lipid Res.* **39**:1629-40.
- **Bose, A., D. Saha, and N. K. Gupta.** 1997. Viral infection. I. Regulation of protein synthesis during vaccinia viral infection of animal cells. *Arch Biochem Biophys.* **342**:362-72.
- **Botarelli, P., B. A. Houlden, N. L. Haigwood, C. Servis, D. Montagna, and S. Abrignani.** 1991. N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J Immunol.* **147**:3128-32.
- **Bouffard, P., P. H. Hayashi, R. Acevedo, N. Levy, and J. B. Zeldis.** 1992. Hepatitis-C Virus Is Detected in a Monocyte Macrophage Subpopulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells of Infected Patients. *J Infect Dis.* **166**:1276-1280.
- **Bradley, D. W., K. A. Caustland, E. H. Cook, C. A. Schable, J. W. Ebert, and J. E. Maynard.** 1985. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: physical evidence that the tubule forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology.* **88**:773-779.
- **Bradley, D. W., E. H. Cook, J. E. Maynard, K. A. Mc-Caustland, J. W. Ebert, G. H. Dolana, R. A. Petzel, R. H. Kantor, A. Heilbrunn, H. A. Fields, and B. L. Murphy.** 1979. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (Factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *Journal of Medical Virology.* **3**:253-269.
- **Bretscher, M. S., and S. Munro.** 1993. Cholesterol and the golgi apparatus. *Science.* **261**:1280-1281.
- **Brown, E. A., H. C. Zhang, L. H. Ping, and S. M. Lemon.** 1992. Secondary Structure of the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis-C Virus and Pestivirus Genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* **20**:5041-5045.
- **Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell.** 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis.* **15**:41-63.

-
- Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1993. At Least 12 Genotypes of Hepatitis-C Virus Predicted by Sequence Analysis of the Putative E1-Gene of Isolates Collected Worldwide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**:8234-8238.
 - Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1992. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:187-91.
 - Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:4942-6.
 - Bukh, J., P. Wantzin, K. Krogsgaard, F. Knudsen, R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1993. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. Copenhagen Dialysis HCV Study Group. *J Infect Dis*. **168**:1343-8.
 - Bulleid, N. J., R. S. Bassel-Duby, R. B. Freedman, and J. F. Sambrook. 1992. Cell-free synthesis of enzymically active tissue-type plasminogen activator. Protein folding determines the extent of N-linked glycosylation. *Biochem. J*. **286**:275-280.
 - Cahour, A. 1995. The perspectives of hepatitis C vaccine: Which strategy to adopt? *M S-Med Sci*. **11**:81-91.
 - Cassidy, M. J., D. Jankelson, M. Becker, T. Dunne, G. Walzl, and M. R. Moosa. 1995. The prevalence of antibodies to hepatitis C virus at two haemodialysis units in South Africa. *S Afr Med J*. **85**:996-8.
 - Cha, T. A., E. Beall, B. Irvine, J. Kolberg, D. Chien, G. Kuo, and M. S. Urdea. 1992. At Least 5 Related, But Distinct, Hepatitis-C Viral Genotypes Exist. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**:7144-7148.
 - Chang, J., S. H. Yang, Y. G. Cho, S. B. Hwang, Y. S. Hahn, and Y. C. Sung. 1998. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol*. **72**:3060-5.
 - Chang, T. T., T. C. Liou, K. C. Young, X. Z. Lin, C. Y. Lin, J. S. Shin, and H. L. Wu. 1994. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: the important role of inapparent transmission. *J Med Virol*. **42**:91-6.
 - Chemello, L., L. Cavalletto, C. Donada, P. Bonetti, P. Casarin, F. Urban, E. Bernardinello, P. Pontisso, and A. Alberti. 1997. Efficacy of a second cycle of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. **113**:1654-9.
 - Chen, C. M., L. R. You, L. H. Hwang, and Y. H. Lee. 1997. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol*. **71**:9417-26.
 - Chen, P. J., M. H. Lin, S. J. Tu, and D. S. Chen. 1991. Isolation of a complementary DNA fragment of hepatitis C virus in taiwan revealed significant sequence variations with other isolates. *hepatology*. **1**:73-78.

-
- **Chicz, R. M., W. S. Lane, R. A. Robinson, M. Trucco, J. L. Strominger, and J. C. Gorga.** 1994. Self-peptides bound to the type I diabetes associated class II MHC molecules HLA-DQ1 and HLA-DQ8. *Int Immunol.* **6**:1639-49.
 - **Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane, and J. L. Strominger.** 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med.* **178**:27-47.
 - **Choo, Q. L., G. Kuo, R. Ralston, A. Weiner, D. Chien, G. Vannest, J. Han, K. Berger, K. Thudium, C. Kuo, J. Kansopon, J. Mcfarland, A. Tabrizi, K. Ching, B. Moss, L. B. Cummins, M. Houghton, and E. Muchmore.** 1994. Vaccination of Chimpanzees Against Infection by the Hepatitis C Virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:1294-1298.
 - **Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* **244**:359-62.
 - **Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, S. R. Medina, P. J. Barr, and a. l. et.** 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:2451-5.
 - **Chou, W. H., T. Yoneyama, K. Takeuchi, H. Harada, I. Saito, and T. Miyamura.** 1991. Discrimination of hepatitis C virus in liver tissues from different patients with hepatocellular carcinomas by direct nucleotide sequencing of amplified cDNA of the viral genome. *J Clin Microbiol.* **29**:2860-4.
 - **Choukhi, A., S. Ung, C. Wychowski, and J. Dubuisson.** 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol.* **72**:3851-8.
 - **Chuang, P. D., and S. L. Morrison.** 1997. Elimination of N-linked glycosylation sites from the human IgA1 constant region - Effects on structure and function. *J Immunol.* **158**:724-732.
 - **Chung, A., and S. A. Older.** 1997. Interferon-alpha associated arthritis. *J Rheumatol.* **24**:1844-5.
 - **Chung, K. M., O. K. Song, and S. K. Jang.** 1997. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells.* **7**:661-7.
 - **Cocquerel, L., J.-C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson.** 1998. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* **72**:2183-2191.
 - **Coelho, L. M., L. J. Jeffers, D. E. Bernstein, J. J. Goodman, K. R. Reddy, M. M. de, X. Li, M. Hill, R. S. La, and E. R. Schiff.** 1995. Hepatitis C virus in alcoholic patients with and without clinically apparent liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* **19**:1173-6.
 - **Conrad, S. F., I. J. Byeon, A. M. DiGeorge, M. D. Lairmore, M. D. Tsai, and P. T. Kaumaya.** 1995. Immunogenicity and conformational properties of an N-linked glycosylated peptide epitope of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV- I). *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids.* **1**:83-92.
 - **Cosson, P., and F. Letourneur.** 1994. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science.* **263**:1629-1631.

-
- Cross, G. A. M. 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane protéins. *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**:1-39.
 - Dahllöf, B., M. Wallins, and S. Kvist. 1991. The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus-2 is microtubule binding. *J. Biol. Chem.* **266**:1804-1808.
 - Davis, D., D. M. Stephens, C. Willers, and P. J. Lachmann. 1990. Glycosylation governs the binding of anti-peptide antibodies to regions of hypervariable amino acid sequence within recombinant gp120 of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*:2889-98.
 - Davis, G. L., and J. Y. Lau. 1997. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology*:122S-127S.
 - De Koning, T., L. Dorland, D. O. van, A. Boonman, J. G. de, N. W. van, S. J. De, M. Duran, van, den, Berg, Iet, G. J. Gerwig, R. Berger, and T. B. Poll. 1998. A Novel Disorder of N-Glycosylation Due to Phosphomannose Isomerase Deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* **245**:38-42.
 - Decastro, M., J. Sanchez, J. F. Herrera, A. Chaves, R. Duran, L. Garciabuey, C. Garciamonzon, J. Sequi, and R. Morenootero. 1993. Hepatitis-C Virus Antibodies and Liver Disease in Patients with Porphyria Cutanea Tarda. *Hepatology.* **17**:551-557.
 - Deck, B., M. Elofsson, J. Kihlberg, and E. R. Unanue. 1995. Specificity of glycopeptide-specific T cells. *J Immunol.* **155**:1074-8.
 - Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol.* **71**:697-704.
 - Delves, P. J. 1998. The role of glycosylation in autoimmune disease [In Process Citation]. *Autoimmunity.* **27**:239-53.
 - DiBisceglie, A. 1997. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*:34S-38S.
 - DiBisceglie, A., Z. D. Goodman, K. G. Ishak, J. H. Hoofnagle, J. J. Melpolder, and H. J. Alter. 1991. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology.* **14**:969-74.
 - Doe, B., K. S. Steimer, and C. M. Walker. 1994. Induction of HIV-1 envelope (gp120)-specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell-derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N-linked glycans. *Eur J Immunol.* **24**:2369-76.
 - Donato, F., A. Tagger, R. Chiesa, M. L. Ribero, V. Tomasoni, M. Fasola, U. Gelatti, G. Portera, P. Boffetta, and G. Nardi. 1997. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Brescia HCC Study. Hepatology.* **26**:579-84.
 - Drummer, H. E., D. C. Jackson, and L. E. Brown. 1993. Modulation of CD4+ T-cell recognition of influenza hemagglutinin by carbohydrate side chains located outside a T-cell determinant. *Virology.* **192**:282-9.
 - Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant Vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* **68**:6147-6160.
 - Dubuisson, J., and C. M. Rice. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**:778-786.

-
- **Dusheiko, G., H. Schmilovitzweiss, D. Brown, F. Mcomish, P. L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds.** 1994. Hepatitis-C Virus Genotypes - An Investigation of Type-Specific Differences in Geographic Origin and Disease. *Hepatology*. **19**:13-18.
 - **Dussol, B., C. Chicheportiche, J. F. Cantaloube, C. Roubicek, P. Biagini, P. Berthezene, and Y. Berland.** 1993. Detection of hepatitis C infection by polymerase chain reaction among hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. **22**:574-80.
 - **Duvet, S., L. Cocquerel, A. Pillez, R. Cacan, A. Verbert, D. Moradpour, C. Wychowski, and J. Dubuisson.** 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J. Biol. Chem*. **273**:32088-32095.
 - **Eckart, M. R., M. Selby, F. Masiarz, C. Lee, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, G. Kuo, M. Houghton, and Q. L. Choo.** 1993. The Hepatitis-C Virus Encodes a Serine Protease Involved in Processing of the Putative Nonstructural Proteins from the Viral Polyprotein Precursor. *Biochem Biophys Res Commun*. **192**:399-406.
 - **Elbein, A. D.** 1979. The role of lipid-linked saccharides in the biosynthesis of complex carbohydrates. *Annu. Rev. Plant Physiol*. **239**:1979.
 - **Enomoto, N., I. Sakuma, and Y. Asahina.** 1995. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b: Sensitivity to interferon is conferred by aminoacid substitution in the NS5A region. *J Clin. Invest*. **96**:224-230.
 - **Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, and N. Izumi.** 1996. Interferon sensitivity determining sequence of the hepatitis C virus genome. *Hepatology*. **24**:460.
 - **Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato.** 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine*. **334**:77-81.
 - **Esteban, R.** 1993. Epidémiology of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. **17**:S67-S71.
 - **Etzioni, A., M. Frydman, S. Pollack, I. Avidor, M. L. Phillips, J. C. Paulson, and R. Gershoni-Baruch.** 1992. Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med*. **327**:1789-1792.
 - **Failla, C., L. Tomei, and R. DeFrancesco.** 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*. **68**:3753-3760.
 - **Farci, P., H. J. Alter, S. Govindarajan, D. C. Wong, R. Engle, R. R. Lesniewski, I. K. Mushahwar, S. M. Desai, R. H. Miller, N. Ogata, and R. H. Purcell.** 1992. Lack of Protective Immunity Against Reinfection with Hepatitis-C Virus. *Science*. **258**:135-140.
 - **Farci, P., H. J. Alter, D. C. Wong, R. H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro, and R. H. Purcell.** 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**:7792-7796.
 - **Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. DeGioannis, A. Strazzera, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter, and R. H. Purcell.** 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in

- chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**:15394-15399.
- **Fayet, Y., S. Galland, A. Degiuli, R. Got, and C. J. Frot**. 1988. Glycoprotein mannosylation in rat liver nuclei. *Biochem Int*. **16**:429-38.
 - **Feinstone, S. M., A. Z. Zapikian, and R. H. Purcell**. 1973. Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*. **182**:1026-1028.
 - **Ferri, C., C. L. La, G. Longombardo, F. Greco, and S. Bombardieri**. 1993. Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest*. **23**:399-405.
 - **Fiedler, K., and K. Simons**. 1995. The role of N-glycans in the sécrétory pathway. *Cell*. **81**:309-312.
 - **Fingerhood, M. I., D. R. Jasinski, and J. T. Sullivan**. 1993. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population [see comments]. *Arch Intern Med*. **153**:2025-30.
 - **Flora, K., M. Schiele, K. Benner, A. Montarano, W. Johnston, R. Witham, and R. Press**. 1996. An outbreak of acute hepatitis C among recipients of intravenous immunoglobulin. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. **76**:160-162.
 - **Fong, T. L., B. A. Di, J. G. Waggoner, S. M. Banks, and J. H. Hoofnagle**. 1991. The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. **14**:64-7.
 - **Fong, T. L., G. C. Kanel, A. Conrad, B. Valinluck, F. Charboneau, and R. H. Adkins**. 1994. Clinical significance of concomitant hepatitis C infection in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*. **19**:554-7.
 - **Fournillier, J. A., A. Cahour, N. Escriou, M. Girad, and C. Wychowski**. 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J Gen Virol*:1055-64.
 - **Fukuda, M. N., A. Dell, and P. Scartezzini**. 1987. Primary defect of congenital dyserythropoietic anemia type II: failure in glycosylation of erythrocyte lactosaminoglycan proteins caused by lowered N-acetylglucosaminyltransferase II. *J. Biol. Chem*. **262**:7195-7206.
 - **Fukuda, M. N., K. A. Masri, A. Dell, L. Luzzato, and K. W. Moremen**. 1990. Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoietic anemia type II (HEMPAS) caused by a gene defect encoding α -mannosidase II. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **87**:7443-7447.
 - **Fukushi, S., K. Katayama, C. Kurihara, N. Ishiyama, F. B. Hoshino, T. Ando, and A. Oya**. 1994. Complete 5' Noncoding Region Is Necessary for the Efficient Internal Initiation of Hepatitis C Virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. **199**:425-432.
 - **Fukushi, S., C. Kurihara, N. Ishiyama, F. B. Hoshino, A. Oya, and K. Katayama**. 1997. The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol*. **71**:1662-1666.
 - **Gale, M. J., K. M. J., and N. M. Tang**. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*. **230**:217-227.

-
- Galili, U., M. R. Clark, S. B. Shohet, J. Buehler, and B. A. Macher. 1987. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1---3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:1369-73.
 - Galli, S. L., E. Meinjohanns, K. Frische, M. Meldal, T. Jensen, O. Werdelin, and S. Mouritsen. 1997. T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: the nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity. *Cancer Res.* **57**:3214-22.
 - Garson, J. A., R. S. Tedder, M. Briggs, P. Tuke, J. A. Glazebrook, A. Trute, D. Parker, J. A. Barbara, M. Contreras, and S. Aloysius. 1990. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity [see comments]. *Lancet.* **335**:1419-22.
 - Gavel, Y., and G. Von Heijne. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**:433-442.
 - Gaynor, E. C., S. Te Heesen, T. R. Graham, M. Aebi, and S. D. Emr. 1994. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* **127**:653-665.
 - Gehle, V. M., E. C. Walcott, T. Nishizaki, and K. Sumikawa. 1997. N-glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* **45**:219-29.
 - Genesca, J., J. Vila, J. Cordoba, S. Sauleda, J. Quer, J. I. Esteban, R. Esteban, L. Piera, and J. Guardia. 1995. Hepatitis C virus infection in renal transplant recipients: epidemiology, clinical impact, serological confirmation and viral replication. *J Hepatol.* **22**:272-7.
 - Gonzalez, Q. A., R. Alende, A. Aguilera, S. Tome, F. Gude, B. E. Perez, A. Torre, V. J. Martinez, and E. Barrio. 1995. [Hepatitis C virus antibodies in alcoholic patients]. *Rev Clin Esp.* **195**:367-72.
 - Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko, and V. M. Binv. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* **17**:4713-4729.
 - Gordon, S. C., R. S. Elloway, J. C. Long, and C. F. Dmuchowski. 1993. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs. intravenous drug use. *Hepatology.* **18**:1338-43.
 - Gordon, S. C., A. H. Patel, G. W. Kulesza, R. E. Barnes, and A. L. Silverman. 1992. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* **87**:1849-51.
 - Grakoui, A., D. W. Mccourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Characterization of the Hepatitis-C Virus-Encoded Serine Proteinase - Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites. *J Virol.* **67**:2832-2843.
 - Grakoui, A., D. W. Mccourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. A Second Hepatitis-C Virus-Encoded Proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:10583-10587.
 - Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products. *J Virol.* **67**:1385-1395.

- Grinnell, B. W., J. D. Walls, and B. Gerlitz. 1991. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J Biol Chem.* **266**:9778-85.
- Guo, Q., E. Vasile, and M. Krieger. 1994. Disruptions in golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by ϵ -COP. *J. Cell Biol.* **125**:1213-1224.
- Gwack, Y., D. W. Kim, J. H. Han, and J. Choe. 1997. DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Eur J Biochem.* **250**:47-54.
- Gwack, Y., D. W. Kim, J. H. Han, and J. Choe. 1995. NTPase activity of hepatitis C virus NS3 protein expressed in insect cells. *Mol Cells.* **5**:171-175.
- Hakomori, S. I. 1989. Aberrant glycosylation in tumor and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv. Cancer Res.* **52**:257-331.
- Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius. 1994. Role of N-linked oligosaccharides, glucose trimming and calnexin during glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:913-917.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Current opinion in cell biology.* **7**:523-529.
- Han, J. H., and M. Houghton. 1992. Group Specific Sequences and Conserved Secondary Structures at the 3' End of HCV Genome and Its Implication for Viral Replication. *Nucleic Acids Res.* **20**:3520.
- Han, J. H., V. Shyamala, K. H. Richman, M. J. Brauer, B. Irvine, M. S. Urdea, O. P. Tekamp, G. Kuo, Q. L. Choo, and M. Houghton. 1991. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:1711-5.
- Hansen, J. E., H. Clausen, C. Nielsen, L. S. Teglbjaerg, L. L. Hansen, C. M. Nielsen, E. Dabelsteen, L. Mathiesen, S. I. Hakomori, and J. O. Nielsen. 1990. Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) infection in vitro by anticarbohydrate monoclonal antibodies: peripheral glycosylation of HIV envelope glycoprotein gp120 may be a target for virus neutralization. *J Virol.* **64**:2833-40.
- Hansen, J. E., C. Nielsen, M. Arendrup, S. Olofsson, L. Mathiesen, J. O. Nielsen, and H. Clausen. 1991. Broadly neutralizing antibodies targeted to mucin-type carbohydrate epitopes of human immunodeficiency virus. *J Virol.* **65**:6461-7.
- Harding, C. V., R. W. Roof, P. M. Allen, and E. R. Unanue. 1991. Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:2740-4.
- Hart, G. W., G. D. Holt, and R. S. Haltiwanger. 1988. Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Trends Biochem. Sci.* **13**:380.
- Hartl, F. U., R. Hlodan, and T. Langer. 1994. molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* **19**:20-25.

-
- Hasegawa, M., T. Orita, T. Kojima, K. Tomonoh, Y. Hirata, and N. Ochi. 1992. Improvement in the heterogenous N-termini and the defective N-glycosylation of human interleukin-6 by genetic engineering. *Eur. J. Biochem.* **210**:9-12.
 - Haurum, J. S., G. Arsequell, A. C. Lellouch, S. Y. Wong, R. A. Dwek, A. J. McMichael, and T. Elliott. 1994. Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I- restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* **180**:739-44.
 - Haurum, J. S., L. Tan, G. Arsequell, P. Frodsham, A. C. Lellouch, P. A. Moss, R. A. Dwek, A. J. McMichael, and T. Elliott. 1995. Peptide anchor residue glycosylation: effect on class I major histocompatibility complex binding and cytotoxic T lymphocyte recognition. *Eur J Immunol.* **25**:3270-6.
 - He, L. F., D. Alling, T. Popkin, M. Shapiro, H. J. Alter, and R. H. Purcell. 1987. Determining the size of non-A, Non-B hepatitis virus by filtration. *J. Infect. Dis.* **156**:636-640.
 - Healey, C. J., N. K. Sabharwal, J. Daub, F. Davidson, P. L. Yap, K. A. Fleming, and C. R. W. G. 1996. Outbreak of acute hepatitis C following the use of anti-hepatitis C virus-screened intravenous immunoglobulin therapy. *Gastroenterology.* **110**:1120-1126.
 - Herbert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1995. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **81**:425-433.
 - Higashi, Y., S. Kakumu, K. Yoshioka, T. Wakita, M. Mizokami, K. Ohba, Y. Ito, T. Ishikawa, M. Takayanagi, and Y. Nagai. 1993. Dynamics of Genome Change in the E2/NS1 Region of Hepatitis-C Virus In vivo. *Virology.* **197**:659-668.
 - Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, Nakagawa, and K. Shimotoho. 1991. Gene mapping of putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:5547-5551.
 - Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno. 1991. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* **175**:220-8.
 - Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. 2 Distinct Proteinase Activities Required for the Processing of a Putative Nonstructural Precursor Protein of Hepatitis-C Virus. *J Virol.* **67**:4665-4675.
 - Hobman, T. C., L. Woodward, and M. G. Farquhar. 1995. Targeting of a heterodimeric membrane protein complex to the Golgi: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Mol Biol Cell.* **6**:7-20.
 - Holst, B., A. W. Brunn, C. K. Kielland, and J. R. Winther. 1996. Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**:3538-3546.
 - Hong, Z., E. Ferrari, M. J. Wright, R. Chase, C. Risano, G. Seelig, C. G. Lee, and A. D. Kwong. 1996. Enzymatic characterization of hepatitis C virus NS3/4A complexes expressed in mammalian cells by using the herpes simplex virus amplicon system. *J Virol.* **70**:4261-8.
 - Hotta, H., M. Kemapunmanus, C. Apichartpiyakul, Soetjipto, R. Handajani, and N. G. Barzaga. 1997. Differential distribution of hepatitis C virus subtypes in Asia: comparative study among

- Thailand, Indonesia, the Philippines and Japan [In Process Citation]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **3**:23-31.
- **Houghton, M., A. Weiner, J. Han, G. Kuo, and Q. L. Choo.** 1991. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology.* **14**:381-8.
 - **Hsieh, T. Y., M. Matsumoto, H. C. Chou, R. Schneider, S. B. Hwang, A. S. Lee, and M. Lai.** 1998. Hepatitis C Virus Core Protein Interacts with Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K. *J Biol Chem.* **273**:17651-9.
 - **Hubbard, S. C., and R. J. Ivatt.** 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **50**:555.
 - **Hunt, C. M., J. A. Dominitz, B. P. Bute, B. Waters, U. Blasi, and D. M. Williams.** 1997. Effect of interferon-alpha treatment of chronic hepatitis C on health- related quality of life. *Dig Dis Sci.* **42**:2482-6.
 - **Huso, D. L., O. Narayan, and G. W. Hart.** 1988. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J Virol.* **62**:1974-80.
 - **Hussy, P., H. Langen, J. Mous, and H. Jacobsen.** 1996. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology.* **224**:93-104.
 - **Hwang, S. B., K. J. Park, Y. S. Kim, Y. C. Sung, and M. M. C. Lai.** 1997. Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology.* **227**:439-446.
 - **Ide, Y., A. Tanimoto, Y. Sasaguri, and R. Padmanabhan.** 1997. Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated in vitro by a stably bound protein kinase from HeLa cells and by cAMP-dependent protein kinase A-alpha catalytic subunit. *Gene.* **201**:151-8.
 - **Ide, Y., L. W. Zhang, M. Chen, G. Inchauspe, C. Bahl, Y. Sasaguri, and R. Padmanabhan.** 1996. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene.* **182**:203-211.
 - **Imperiali, B., and K. L. Shannon.** 1991. Differences between Asn-Xaa-Thr-containing peptides: a comparison of solution conformation and substrate behavior with oligosaccharyltransferase. *Biochemistry.* **30**:4374-4380.
 - **Inchauspe, G., M. E. Major, I. Nakano, L. Vivitski, and C. Trepo.** 1997. DNA vaccination for the induction of immune response against hepatitis C virus proteins. *Vaccine.* **15**:953-956.
 - **Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta.** 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* **244**:35-40.
 - **Ishihama, A., and P. Barbier.** 1994. Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerases. *Arch Virol.* **134**:235-258.
 - **Ishioka, G. Y., A. G. Lamont, D. Thomson, N. Bulbow, F. C. Gaeta, A. Sette, and H. M. Grey.** 1992. MHC interaction and T cell recognition of carbohydrates and glycopeptides. *J Immunol.* **148**:2446-51.

-
- **Ito, T., and M. M. Lai.** 1997. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol.* **71**:8698-706.
 - **Ito, T., J. Mukaigawa, J. Zuo, Y. Hirabayashi, K. Mitamura, and K. Yasui.** 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*:1043-54.
 - **Jackson, D. C., H. E. Drummer, L. Urge, L. J. Otvos, and L. E. Brown.** 1994. Glycosylation of a synthetic peptide representing a T-cell determinant of influenza virus hemagglutinin results in loss of recognition by CD4+ T-cell clones. *Virology.* **199**:422-30.
 - **Jackson, M. R., T. Nilsson, and P. A. Peterson.** 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**:3153-3162.
 - **Jackson, M. R., T. Nilsson, and P. A. Peterson.** 1993. Retrieval of transmembrane protein to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **121**:317-333.
 - **Jaeken, J., M. Vander Schiedren-Iodeweyckx, P. Casaer, L. Snoeck, L. Corbeel, E. Eggermont, and R. Eeckles.** 1980. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum asylsulfatase A and increased CSF protein: a new syndrome ? *Pediatr. Res.* **14**:179.
 - **Kaetzel, D. M., D. Morgan, J. D. Reid, and R. A. Fenstermaker.** 1996. Site-directed mutagenesis of the N-linked glycosylation site in platelet-derived growth factor B-chain results in diminished intracellular retention. *Bba Protein Struct Mol Enzym.* **1298**:250-260.
 - **Kaito, M., S. Watanabe, K. K. Tsukiyama, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, and M. Kohara.** 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*:1755-60.
 - **Kamer, G., and R. Argos.** 1984. Primary structural comparison of RNA-dependant polymerase from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* **12**:27269-7282.
 - **Kane, S. E.** 1993. Mouse procathepsin L lacking a functional glycosylation site is properly folded, stable, and secreted by NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**:11456-11462.
 - **Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, and K. Shimotohno.** 1994. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun.* **205**:320-326.
 - **Kaplan, H. A., J. K. Welply, and W. J. Lennarz.** 1987. Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **906**:161-173.
 - **Kasturi, L., J. R. Eshleman, W. H. Wunner, and S. H. Shakin-Eshleman.** 1995. The hydroxy amino acid in Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**:14756-14761.
 - **Katayama, T., T. Mazda, S. Kikuchi, S. Harada, Y. Matsuura, J. Chiba, H. Ohba, I. Saito, and T. Miyamura.** 1992. Improved Serodiagnosis of Non-A, Non-B Hepatitis by an Assay Detecting Antibody to Hepatitis-C Virus Core Antigen. *Hepatology.* **15**:391-394.

-
- Kato, N., K. H. Lan, N. S. Ono, Y. Shiratori, and M. Omata. 1997. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol.* **71**:8856-9.
 - Kato, N., Y. Ootsuyama, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, S. Mori, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1991. Distribution of Plural HCV Types in Japan. *Biochem Biophys Res Commun.* **181**:279-285.
 - Kato, N., Y. Ootsuyama, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, H. Sekiya, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1992. Characterization of Hypervariable Regions in the Putative Envelope Protein of Hepatitis-C Virus. *Biochem Biophys Res Commun.* **189**:119-127.
 - Kato, N., Y. Ootsuyama, H. Sekiya, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1994. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* **68**:4776-4784.
 - Kato, N., Y. Ootsuyama, T. Tanaka, M. Nakagawa, T. Nakazawa, K. Muraiso, S. Ohkoshi, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1992. Marked Sequence Diversity in the Putative Envelope Proteins of Hepatitis-C Viruses. *Virus Res.* **22**:107-123.
 - Khorsi, H., S. Castelain, A. Wyseur, and G. Duverlie. 1997. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 aminoacid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in french patients. *J. Hepathol.* **27**:72-77.
 - Khorsi, H., T. Salabi, S. Castelain, O. Jaillon, P. Zawadzki, J. P. Capron, F. Eb, C. Wychowski, and G. Duverlie. 1998. Amplification and detection of the terminal 3' non-coding region of hepatitis C virus isolates. *Res Virol.* **149**:115-21.
 - Kim, D. W., Y. Gwack, J. H. Han, and J. Choe. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:160-166.
 - Kim, D. W., J. Kim, Y. Gwack, J. H. Han, and J. Choe. 1997. Mutational analysis of the hepatitis C virus RNA helicase. *J Virol.* **71**:9400-9.
 - Kim, J. L., K. A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M. D. Dwyer, J. A. Landro, S. P. Chambers, W. Markland, C. A. Lepre, E. T. O'Malley, S. L. Harbeson, C. M. Rice, M. A. Murcko, P. R. Caron, and J. A. Thomson. 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide [published erratum appears in *Cell* 1997 Apr 4;89(1):159]. *Cell.* **87**:343-55.
 - Kiyosawa, K., T. Sodeyama, E. Tanaka, Y. Gibo, K. Yoshizawa, Y. Nakano, S. Furuta, Y. Akahane, K. Nishioka, R. H. Purcell, and a. I. et. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*:671-5.
 - Kiyosawa, K., E. Tanaka, T. Sodeyama, K. Yoshizawa, K. Yabu, K. Furuta, H. Imai, Y. Nakano, S. Usuda, K. Uemura, and a. I. et. 1994. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community- acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. *Gastroenterology.* **106**:1596-602.
 - Kleter, B., J. T. Brouwer, F. Nevens, D. L. van, A. Elewaut, J. Versieck, P. P. Michielsens, M. L. Hautekeete, R. A. Chamuleau, R. Brenard, N. Bourgeois, M. Adler, W. G. Quint, C. M. Bronkhorst, R. A. Heijntink, W. J. Hop, J. Fevery, and S. W. Schalm. 1998. Hepatitis C virus

- genotypes: epidemiological and clinical associations. Benelux Study Group on Treatment of Chronic Hepatitis C. *Liver*. **18**:32-8.
- **Kobata, A.** 1984. Biology of carbohydrate, p. chapter 2, Biology of carbohydrate., vol. 2. Ginsburg, V.
- Robbins, P. W.
- **Kolykhalov, A. A., E. V. Agapov, K. J. Blight, K. Mihalik, F. S. M., and C. M. Rice.** 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. **277**:570-574.
- **Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, and C. M. Rice.** 1996. Identification of a highly conserved element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*. **70**:3363-3371.
- **Koonin, E. V.** 1991. Similarities in RNA helicases. *Nature*. **352**:290.
- **Kornfeld, R., and S. Kornfeld.** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631.
- **Kornfeld, S.** 1998. Diseases of abnormal protein glycosylation: an emerging area [editorial; comment]. *J Clin Invest.* **101**:1293-5.
- **Koskinas, J., B. M. Mcfarlane, K. T. Nouriaria, C. J. Tibbs, M. Mizokami, P. T. Donaldson, I. G. Mcfarlane, and R. Williams.** 1994. Cellular and humoral immune reactions against autoantigens and hepatitis C viral antigens in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. **107**:1436-1442.
- **Krawczynski, K., M. J. Alter, and D. L. Tankersley.** 1996. Effect of immune globulin on the prevention of experimental hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* **173**:822-828.
- **Kumar, U., J. Monjardino, and H. C. Thomas.** 1994. Hypervariable Region of Hepatitis-C Virus Envelope Glycoprotein (E2 NS1) in an Agammaglobulinemic Patient. *Gastroenterology*. **106**:1072-1075.
- **Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens, and a. l. et.** 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. **244**:362-4.
- **Kurauchi, O., T. Furui, A. Itakura, H. Ishiko, M. Sugiyama, Y. Ohno, H. Ando, A. Tanamura, T. Ishida, A. Nawa, and a. l. et.** 1993. Studies on transmission of hepatitis C virus from mother-to-child in the perinatal period. *Arch Gynecol Obstet.* **253**:121-6.
- **Kurosaki, M., N. Enomoto, F. Marumo, and C. Sato.** 1993. Rapid Sequence Variation of the Hypervariable Region of Hepatitis-C Virus During the Course of Chronic Infection. *Hepatology*. **18**:1293-1299.
- **Kurosaki, M., N. Enomoto, T. Murakami, I. Sakuma, Y. Asahina, C. Yamamoto, T. Ikeda, S. Tozuka, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato.** 1997. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology*. **25**:750-753.
- **Laczko, I., M. Hollosi, L. Urge, K. E. Ugen, D. B. Weiner, H. H. Mantsch, J. Thurin, and L. J. Otvos.** 1992. Synthesis and conformational studies of N-glycosylated analogues of the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Biochemistry*. **31**:4282-8.

-
- Landberg, E., P. Pahlsson, H. Krotkiewski, M. Stromqvist, L. Hansson, and A. Lundblad. 1997. Glycosylation of bile-salt-stimulated lipase from human milk: comparison of native and recombinant forms. *Arch Biochem Biophys.* **344**:94-102.
 - Landro, J. A., S. A. Raybuck, Y. Luong, E. T. O'Malley, S. L. Harbeson, K. A. Morgenstern, G. Rao, and D. J. Livingston. 1997. Mechanistic role of an NS4A peptide cofactor with the truncated NS3 protease of hepatitis C virus: elucidation of the NS4A stimulatory effect via kinetic analysis and inhibitor mapping. *Biochemistry.* **36**:9340-8.
 - Lanford, R. E., L. Notvall, D. Chavez, R. White, G. Frenzel, C. Simonsen, and J. Kim. 1993. Analysis of Hepatitis-C Virus Capsid, E1, and E2/NS1 Proteins Expressed in Insect Cells. *Virology.* **197**:225-235.
 - Lemon, S. M., and M. Honda. 1997. Internal ribosome entry sites within the RNA genomes of hepatitis C virus and other Flaviviruses. *Seminars in VIROLOGY.* **8**:274-288.
 - Lennarz, W. J. 1980. Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans. *In* P. Press (ed.).
 - Lerat, H., and G. Inchauspé. 1997. Tropisme extrahépatique du virus de l'hépatite C. *Virologie.* **1**:291-300.
 - Lewis, M. J., and H. R. Pelham. 1992. Ligand-induced redistribution of human KDEL receptor from the golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell.* **68**:353-364.
 - Li, J. S., S. P. Tong, L. Vitvitski, D. Lepot, and C. Trepo. 1991. Evidence of Two Major Genotypes of Hepatitis-C Virus in France and Close Relatedness of the Predominant One with the Prototype Virus. *J Hepatol.* **13**:S33-S37.
 - Liljeström, P., and H. Garoff. 1991. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J. Virol.* **65**:147-154.
 - Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, D. W. Mccourt, and C. M. Rice. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: Identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol.* **68**:5063-5073.
 - Lin, C., B. M. Pragai, A. Grakoui, J. Xu, and C. M. Rice. 1994. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-Cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol.* **68**:8147-8157.
 - Lin, C., J. W. Wu, K. Hsiao, and M. S. Su. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol.* **71**:6465-71.
 - Lin, D. Y., H. H. Lin, C. C. Huang, and Y. F. Liaw. 1993. High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Taiwan. *Am J Kidney Dis.* **21**:288-91.
 - Lindsay, K. L. 1997. Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology*:71S-77S.
 - Littman, D. R., Y. Thomas, P. J. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell.* **40**:237-46.
 - Liu, Q. Y., C. Tackney, R. A. Bhat, A. M. Prince, and P. Zhang. 1997. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol.* **71**:657-662.
 - Livi, G. P., J. S. Lillquist, L. M. Miles, A. Ferrara, G. M. Sathe, P. L. Simon, C. A. Meyers, J. A. Gorman, and P. R. Young. 1991. Secretion of N-glycosylated interleukin-1 β in *saccharomyces*

- cerevisiae using a leader peptide from candida albicans. Effect of N-glycosylation on biological activity. *J. Biol. Chem.* **266**:15348-15355.
- **Lo, S. Y., F. Masiarz, S. B. Hwang, M. M. Lai, and J. H. Ou.** 1995. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology.* **213**:455-61.
 - **Lo, S. Y., M. Selby, M. Tong, and J. H. Ou.** 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**:124-31.
 - **Locker, J. K., J. Klumperman, V. Oorschot, M. C. Horzinek, H. J. Geuze, and P. J. Rottier.** 1994. The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. *J Biol Chem.* **269**:28263-9.
 - **Longenecker, B. M., M. Reddish, R. Koganty, and G. D. MacLean.** 1994. Specificity of the IgG response in mice and human breast cancer patients following immunization against synthetic sialyl-Tn, an epitope with functional significance in metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **353**:105-124.
 - **Lopez, L. F., S. Ampurdanes, X. Fornas, A. Castells, J. C. Saiz, J. Costa, J. Bruix, T. J. Sanchez, Jimenez, de, Anta, Mt, and J. Rodes.** 1997. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* **27**:959-65.
 - **Love, R. A., H. E. Parge, J. A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E. W. Moomaw, T. Adachi, S. Margosiak, E. Dagostino, and Z. Hostomska.** 1998. The conformation of hepatitis C virus NS3 proteinase with and without NS4A: a structural basis for the activation of the enzyme by its cofactor [In Process Citation]. *Clin Diagn Virol.* **10**:151-6.
 - **Lu, X., A. Mehta, M. Dadmarz, R. Dwek, B. S. Blumberg, and T. M. Block.** 1997. Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:2380-5.
 - **Lu, X., A. Mehta, R. Dwek, T. Butters, and T. Block.** 1995. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology.* **213**:660-5.
 - **Lunel, F., N. Abuaf, L. Franguel, P. Gripon, M. Perrin, Y. Lecoz, D. Valla, E. Borotto, A. M. Yamamoto, J. M. Huraux, P. Opolon, and J. C. Homberg.** 1992. Liver/Kidney Microsome Antibody Type-1 and Hepatitis-C Virus Infection. *Hepatology.* **16**:630-636.
 - **Lunel, F., L. Musset, P. Cacoub, L. Frangeul, P. Cresta, M. Perrin, P. Gripon, C. Hoang, J. C. Piette, J. M. Huraux, and P. Opolon.** 1994. Cryoglobulinemia in Chronic Liver Diseases - Role of Hepatitis C Virus and Liver Damage. *Gastroenterology.* **106**:1291-1300.
 - **Maayan, S., E. N. Shufman, D. Engelhard, and D. Shouval.** 1994. Exposure to hepatitis B and C and to HTLV-1 and 2 among Israeli drug abusers in Jerusalem. *Addiction.* **89**:869-74.
 - **Machamer, C. E., M. G. Grim, A. Esquela, S. W. Chung, M. Rolls, K. Ryan, and A. M. Swift.** 1993. Retention of a cis golgi protein requires polar residues on one face of a predicted alfa-helix in the transmembrane domain. *Mol. Biol. Cell.* **4**:695-704.
 - **Machamer, C. E., and J. K. Rose.** 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol.* **105**:1205-14.

-
- MacLean, G. D., M. B. Bowen-Yacyshyn, J. Samuel, A. Meikle, G. Stuart, J. Nation, S. Poppema, M. Jerry, R. Koganty, T. Wong, and B. M. Longenecker. 1992. Active immunization of human ovarian cancer patients against a common carcinoma (Thomsen-Friedenreich) determinant using a synthetic carbohydrate antigen. *J. Immunother.* **11**:292-305.
 - MacLean, G. D., M. Reddish, R. Koganty, T. Wong, S. Gandhi, M. Smolenski, J. Samuel, J. M. Nabholz, and B. M. Longenecker. 1993. Immunization of breast cancer patients using a synthetic sialyl-Tn glycoconjugate plus Detox adjuvant. *Cancer Immunol. Immunother.* **36**:215-222.
 - Marshall, R. D. 1974. The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* **40**:17-26.
 - Martell, M., J. I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1992. Hepatitis-C Virus (HCV) Circulates as a Population of Different But Closely Related Genomes - Quasispecies Nature of HCV Genome Distribution. *J Virol.* **66**:3225-3229.
 - Martell, M., J. I. Esteban, J. Quer, V. Vargas, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1994. Dynamic Behavior of Hepatitis C Virus Quasispecies in Patients Undergoing Orthotopic Liver Transplantation. *J Virol.* **68**:3425-3436.
 - Martina, J. A., J. L. Daniotti, and H. J. Maccioni. 1998. Influence of N-glycosylation and N-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase. *J Biol Chem.* **273**:3725-31.
 - Massibay, A. S., P. V. Balaji, E. E. Boeggeman, and P. K. Qasba. 1993. Mutational analysis of the golgi retention signal of bovine β -1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**:9908-9916.
 - Matsumoto, M., T. Y. Hsieh, N. L. Zhu, T. VanArsdale, S. B. Hwang, K. S. Jeng, A. E. Gorbalenya, S. Y. Lo, J. H. Ou, C. F. Ware, and M. M. C. Lai. 1997. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol.* **71**:1301-1309.
 - Matsuura, Y., S. Harada, R. Suzuki, Y. Watanabe, Y. Inoue, I. Saito, and T. Miyamura. 1992. Expression of Processed Envelope Protein of Hepatitis-C Virus in Mammalian and Insect Cells. *J Virol.* **66**:1425-1431.
 - Matsuura, Y., T. Suzuki, R. Suzuki, M. Sato, H. Aizaki, I. Saito, and T. Miyamura. 1994. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology.* **205**:141-150.
 - Matthijs, G., E. Schollen, E. Pardon, Veiga, Da, M. Cunha, J. Jaeken, J. J. Cassiman, and S. E. Van. 1997. Mutations in PMMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome) [published erratum appears in *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):316]. *Nat Genet.* **16**:88-92.
 - Mauserbunschoten, E. P., D. Bresters, A. A. J. Vandrimmelen, G. Roosendaal, H. T. M. Cuypers, H. W. Reesink, C. L. Vanderpoel, H. M. Vandenberg, and P. N. Lelie. 1995. Hepatitis C infection and viremia in Dutch hemophilia patients. *J Med Virol.* **45**:241-246.
 - McAllister, J., C. Casino, F. Davidson, J. Power, E. Lawlor, P. L. Yap, P. Simmonds, and D. B. Smith. 1998. Long-term evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus in a common-source-infected cohort. *J Virol.* **72**:4893-905.

-
- **McGinnes, L. W., and T. G. Morrison.** 1997. Disulfide bond formation is a determinant of glycosylation site usage in the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Virol.* **71**:3083-9.
 - **Mcomish, F., S. W. Chan, B. C. Dow, J. Gillon, W. D. Frame, R. J. Crawford, P. L. Yap, E. A. C. Follett, and P. Simmonds.** 1993. Detection of Three Types of Hepatitis-C Virus in Blood Donors - Investigation of Type-Specific Differences in Serologic Reactivity and Rate of Alanine Aminotransferase Abnormalities. *Transfusion.* **33**:7-13.
 - **Mcomish, F., P. L. Yap, B. C. Dow, E. A. C. Follett, C. Seed, A. J. Keller, T. J. Cobain, T. Krusius, E. Kolho, R. Naukkarinen, C. Lin, C. Lai, S. Leong, G. A. Medgyesi, M. Hejjas, H. Kiyokawa, K. Fukada, T. Cuyppers, A. A. Saeed, A. M. Alrasheed, M. Lin, and P. Simmonds.** 1994. Geographical Distribution of Hepatitis-C Virus Genotypes in Blood Donors - An International Collaborative Survey. *J Clin Microbiol.* **32**:884-892.
 - **Mehta, A., T. M. Block, and R. A. Dwek.** 1998. The role of N-linked glycosylation in the secretion of hepatitis B virus [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol.* **435**:195-205.
 - **Mehta, A., X. Lu, T. M. Block, B. S. Blumberg, and R. A. Dwek.** 1997. Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:1822-7.
 - **Meisel, H., A. Reip, B. Faltus, M. Lu, H. Porst, M. Wiese, M. Roggenford, and D. H. Kruger.** 1995. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet.* **345**:1209-1211.
 - **Mele, A., R. Corona, M. E. Tosti, F. Palumbo, A. Moiraghi, F. Novaco, C. Galanti, R. Bernacchia, and P. Ferraro.** 1995. Beauty treatments and risk of parenterally transmitted hepatitis: results from the hepatitis surveillance system in Italy. *Scand J Infect Dis.* **27**:441-4.
 - **Mellquist, J. L., L. Kasturi, S. L. Spitalnik, and E. S. Shakin.** 1998. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry.* **37**:6833-7.
 - **Mendenhall, C. L., T. Moritz, S. Rouster, G. Roselle, A. Polito, S. Quan, and R. K. DiNelle.** 1993. Epidemiology of hepatitis C among veterans with alcoholic liver disease. The VA Cooperative Study Group 275. *Am J Gastroenterol.* **88**:1022-6.
 - **Mendenhall, C. L., L. Seeff, A. M. Diehl, S. J. Ghosn, S. W. French, P. S. Gartside, S. D. Rouster, B. Z. Buskell, C. J. Grossman, G. A. Roselle, and a. I. et.** 1991. Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis: their prevalence and clinical relevance. The VA Cooperative Study Group (No. 119) [see comments]. *Hepatology*:581-9.
 - **Meurs, E. F.** 1997. Mécanismes d'action antivirale de l'interféron. *Virologie.* **1**:481-497.
 - **Michaelsson, E., V. Malmstrom, S. Reis, A. Engstrom, H. Burkhardt, and R. Holmdahl.** 1994. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J Exp Med.* **180**:745-9.
 - **Michalak, J. P., C. Wychowski, A. Choukhi, J. C. Meunier, S. Ung, C. M. Rice, and J. Dubuisson.** 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol*:2299-306.

-
- **Miller, R. H., and R. H. Purcell.** 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:2057-61.
 - **Mirazimi, A., and L. Svensson.** 1998. Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7. *J Virol.* **72**:3887-92.
 - **Miyajima, I., M. Sata, R. Kumashiro, Y. Uchimura, T. Ide, H. Suzuki, and K. Tanikawa.** 1998. The incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after interferon treatment. *Oncol Rep.* **5**:201-4.
 - **Mizuno, M., G. Yamada, T. Tanaka, K. Shimotohno, M. Takatani, and T. Tsuji.** 1995. Virion-like structures in Hela G cell transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology.* **109**:1933-1940.
 - **Mizushima, H., M. Hijikata, S. I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno.** 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol.* **68**:6215-6222.
 - **Mizushima, H., M. Hijikata, Y. Tanji, K. Kimura, and K. Shimotohno.** 1994. Analysis of N-Terminal Processing of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2. *J Virol.* **68**:2731-2734.
 - **Moradpour, D., P. Kary, C. M. Rice, and H. E. Blum.** 1998. Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins [In Process Citation]. *Hepatology.* **28**:192-201.
 - **Morfini, M., P. M. Mannucci, N. Ciavarella, M. Schiavoni, A. Gringeri, D. Rafanelli, B. E. Di, A. Chistolini, A. Tagliaferri, G. Rodorigo, and a. I. et.** 1994. Prevalence of infection with the hepatitis C virus among Italian hemophiliacs before and after the introduction of virally inactivated clotting factor concentrates: a retrospective evaluation. *Vox Sang.* **67**:178-82.
 - **Moriya, T., F. Sasaki, M. Mizui, N. Ohno, H. Mohri, S. Mishiro, and H. Yoshizawa.** 1995. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants: its frequency and risk factors revisited. *Biomed Pharmacother.* **49**:59-64.
 - **Mouritsen, S., M. Meldal, B. I. Christiansen, H. Elsnér, and O. Werdelin.** 1994. Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity. *Eur J Immunol.* **24**:1066-72.
 - **Muller, H. M., E. Pfaff, T. Goeser, B. Kallinowski, C. Solbach, and L. Theilmann.** 1993. Peripheral Blood Leukocytes Serve as a Possible Extrahepatic Site for Hepatitis-C Virus Replication. *J Gen Virol.* **74**:669-676.
 - **Munro, S.** 1991. sequences within and adjacent to the transmembrane segment of α -2,6-sialyltransferase specify golgi retention. *EMBO J.* **10**:3577-3588.
 - **Munro, S., and H. R. Pelham.** 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* **48**:899-907.
 - **Muylaert, I. R., T. J. Chambers, R. Galler, and C. M. Rice.** 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology.* **222**:159-68.

-
- Nakagiri, I., and K. Ichihara. 1995. ELISA for anti-HCV antibody employing a shorter synthetic core region peptide. *J Virol Methods*. **52**:195-207.
 - Nakashima, K., H. Ikematsu, J. Hayashi, Y. Kishihara, A. Mutsutake, and S. Kashiwagi. 1995. Intrafamilial transmission of hepatitis-C virus among the population of an endemic area of Japan. *Jama*. **274**:1459-61.
 - Nakazawa, T., N. Kato, Y. Ootsuyama, H. Sekiya, T. Fujioka, A. Shibuya, and K. Shimotohno. 1994. Genetic Alteration of the Hepatitis-C Virus Hypervariable Region Obtained from an Asymptomatic Carrier. *Int J Cancer*. **56**:204-207.
 - Nemansky, M., N. R. Thotakura, C. D. Lyons, S. Ye, B. B. Reinhold, V. N. Reinhold, and D. L. Blithe. 1998. Developmental changes in the glycosylation of glycoprotein hormone free alpha subunit during pregnancy [In Process Citation]. *J Biol Chem*. **273**:12068-76.
 - Newton, S. A., K. T. Yeo, T. K. Yeo, J. B. Parent, and K. Olden. 1987. In vertebrate lectins, p. 211-226. *In* K. O. a. J. B. Parent (ed.). Nex York: Van Nostrand Reinhold.
 - Niehues, R., M. Hasilik, G. Alton, C. Korner, S. M. Schiebe, H. G. Koch, K. P. Zimmer, R. Wu, E. Harms, K. Reiter, F. K. von, H. H. Freeze, H. K. Harms, and T. Marquardt. 1998. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy [see comments]. *J Clin Invest*. **101**:1414-20.
 - Nilsson, I., and G. Von Heijne. 1993. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*. **268**:5798-5801.
 - Nilsson, T., M. H. Hoe, P. Slusarewicz, C. Rabouille, and R. Watson. 1994. Kin recognition between medial golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J*. **13**:562-574.
 - Nilsson, T., J. M. Lucocq, D. Mackay, and G. Warren. 1991. The membrane spanning domain of β -1,4-galactosyltransferase specifies trans-golgi localisation. *EMBO J*. **10**:3567-3575.
 - Nilsson, T., P. Slusarewicz, M. H. Hoe, and G. Warren. 1993. Kin recognition. A model for the retention of golgi enzymes. *FEBS Lett*. **330**:1-4.
 - Nishizono, A., H. Terao, R. Shutoh, M. Nasu, K. Mifune, B. J. Wun, B. Montas, and F. S. Fernandez. 1997. Genotyping of hepatitis C virus in the Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg*. **57**:719-22.
 - Nousbaum, J. B. 1998. [Genomic subtypes of hepatitis C virus: epidemiology, diagnosis and clinical consequences]. *Bull Soc Pathol Exot*. **91**:29-33.
 - Nousbaum, J. B., S. Pol, B. Nalpas, P. Landais, P. Berthelot, C. Brechot, M. Gigou, C. Feray, V. Thiers, H. Okamoto, S. Mishiro, K. Poussin, P. Paterlini, M. Rumi, and M. Colombo. 1995. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med*. **122**:161.
 - Okamoto, H., M. Kojima, S. I. Okada, H. Yoshizawa, H. Iizuka, T. Tanaka, E. E. Muchmore, D. A. Peterson, Y. Ito, and S. Mishiro. 1992. Genetic Drift of Hepatitis-C Virus During an 8.2-Year Infection in a Chimpanzee - Variability and Stability. *Virology*. **190**:894-899.

-
- Okuda, K., H. Hayashi, S. Kobayashi, and Y. Irie. 1995. Mode of hepatitis C infection not associated with blood transfusion among chronic hemodialysis patients. *J Hepatol.* **23**:28-31.
 - Olden, K., J. B. Parent, and S. L. White. 1982. Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function. *Biochim. Biophys. Acta.* **650**:209-232.
 - Olofsson, S., I. Sjoblom, and S. Jeansson. 1990. Activity of herpes simplex virus type 1-specified glycoprotein C antigenic site II epitopes reversibly modulated by peripheral fucose or galactose units of glycoprotein oligosaccharides. *J Gen Virol*:889-95.
 - Opdenakker, G., P. M. Rudd, C. P. Ponting, and R. A. Dwek. 1993. Concept and principles of glycobiology. *FASEB J.* **7**:1330-1337.
 - Orci, L., R. Montesano, P. Meda, F. Malaisse-Lagae, D. Brown, A. Perrelet, and P. Vassalli. 1981. Heterogenous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the gogi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:293-297.
 - Otvos, L. J., G. R. Krivulka, L. Urge, G. I. Szendrei, L. Nagy, Z. Q. Xiang, and H. C. Ertl. 1995. Comparison of the effects of amino acid substitutions and beta-N- vs. alpha-O-glycosylation on the T-cell stimulatory activity and conformation of an epitope on the rabies virus glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* **1267**:55-64.
 - Otvos, L. J., J. Thurin, E. Kollat, L. Urge, H. H. Mantsch, and M. Hollosi. 1991. Glycosylation of synthetic peptides breaks helices. Phosphorylation results in distorted structure. *Int J Pept Protein Res.* **38**:476-82.
 - Ou, W. J., P. H. Cameron, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bregeron. 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature.* **364**:771-776.
 - Parodi, A. J., D. H. Mendelzon, and G. Z. Lederkremer. 1983. Transient glucosylation of protein-bound Man₉GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ in calf thyroid cells: a possible recognition signal in the processing of glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **258**:8260-8265.
 - Pascale, M. C., M. C. Erra, N. Malagolini, C. F. Serafini, A. Leone, and S. Bonatti. 1992. Post-translational processing of an O-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane. *J Biol Chem.* **267**:25196-201.
 - Pawlotsky, J. M. 1996. Chronic hepatitis C: Therapeutic questions. The virological stand point. *Gastroenterol Clin Biol.* **20**:1047-1048.
 - Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, A. U. Neumann, M. Pellerin, P. O. Frainais, and D. Dhumeaux. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol.* **72**:2795-805.
 - Pawlotsky, J. M., T. F. Roudot, A. Bastie, F. Darthuy, J. Remire, J. M. Metreau, E. S. Zafrani, J. Duval, and D. Dhumeaux. 1996. Factors affecting treatment responses to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* **174**:1-7.
 - Pawlotsky, J. M., T. F. Roudot, A. Bastie, C. Pellet, J. Duval, and D. Dhumeaux. 1996. Are hepatitis C virus genotypes 1a and 1b so different? [letter; comment]. *Hepatology.* **23**:1289-91.

-
- Pawlowsky, J. M., L. Tsakiris, F. Roudotthoraval, C. Pellet, L. Stuyver, J. Duval, and D. Dhumeaux. 1995. Relationship between hepatitis c virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis c. *J Infect Dis.* **171**:1607-1610.
 - Pelham, H. R. 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:1-23.
 - Pelham, H. R. 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biol. Sci.* **15**:483-486.
 - Pelham, H. R. B. 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Curr. Op. Cell Biol.* **7**:530-535.
 - Persson, B., and P. Argos. 1997. Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J Protein Chem.* **16**:453-7.
 - Peterson, J. R., A. Ora, P. Nguyen Van, and A. Helenius. 1995. Transient lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoprotein. *Mol. Biol.* **6**:1173-1184.
 - Petterson, R. F. 1991. Protein localisation and virus assembly at intracellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:67-104.
 - Pizzi, E., A. Tramontano, L. Tomei, N. Lamonica, C. Failla, M. Sardana, T. Wood, and R. Defrancesco. 1994. Molecular Model of the Specificity Pocket of the Hepatitis-C Virus Protease - Implications for Substrate Recognition. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:888-892.
 - Ploegh, H. L., H. T. Orr, and J. L. Strominger. 1981. Biosynthesis and cell surface localization of nonglycosylated human histocompatibility antigens. *J. Immunol.* **126**:270-275.
 - Pozzato, G., S. Kaneko, M. Moretti, L. S. Croce, F. Franzin, M. Unoura, L. Bercich, C. Tiribelli, M. Crovatto, G. Santini, and K. Kobayashi. 1994. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol.* **43**:291-296.
 - Pozzato, G., M. Moretti, F. Franzin, L. S. Croce, C. Tiribelli, T. Masayu, S. Kaneko, M. Unoura, and K. Kobayashi. 1991. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones [letter]. *Lancet.* **338**:509.
 - Prince, A. M. 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **60**:814-821.
 - Puntoriero, G., A. Meola, A. Lahm, S. Zucchelli, E. B. Bruni, R. Tafi, M. Pezzanera, M. U. Mondelli, R. Cortese, A. Tramontano, G. Galfre', and A. Nicosia. 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J.* **17**:3521-33.
 - Puro, V., N. Petrosillo, and G. Ippolito. 1995. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control.* **23**:273-7.
 - Rademacher, T., R. B. Parekh, and R. Dwek. 1988. Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:785-838.

-
- **Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q. L. Choo.** 1993. Characterization of Hepatitis-C Virus Envelope Glycoprotein Complexes Expressed by Recombinant Vaccinia Viruses. *J Virol.* **67**:6753-6761.
 - **Rau, S., R. Geyer, and R. W. Friedrich.** 1993. The role of gp55 N-glycosylation in pathogenesis of Friend spleen focus-forming virus. *J Gen Virol*:699-705.
 - **Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer, and R. Ray.** 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol.* **70**:4438-43.
 - **Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer, R. Steele, and R. Ray.** 1995. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res.* **37**:209-20.
 - **Ray, R. B., K. Meyer, and R. Ray.** 1996. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology.* **226**:176-182.
 - **Ray, R. B., K. Meyer, R. Steele, A. Shrivastava, B. B. Aggarwal, and R. Ray.** 1998. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.* **273**:2256-9.
 - **Reed, K. E., A. E. Gorbalenya, and C. M. Rice.** 1998. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol.* **72**:6199-206.
 - **Reed, K. E., J. Xu, and C. M. Rice.** 1997. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol.* **71**:7187-97.
 - **Reitman, M. L., A. Varki, and S. Kornfeld.** 1981. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoproteine N-acetylglucosaminyl phosphotransferase activity. *J. Clin. Invest.* **67**:1574-1579.
 - **Rice, C. M.** 1996. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology.* **third edition**:931-959.
 - **Rickert, K. W., and B. Imperiali.** 1995. Analysis of the conserved glycosylation site in the nicotinic acetylcholine receptor: potential roles in complex assembly. *Chem Biol.* **2**:751-9.
 - **Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, T. Vanderstraaten, L. Whetter, G. Inchauspe, S. Lemon, and W. Spaan.** 1995. Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis c virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett.* **365**:115-119.
 - **Roberts, P. C., W. Garten, and H. D. Klenk.** 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol.* **67**:3048-60.
 - **Roitsch, T., and L. Lehle.** 1989. Structural requirements for protein N-glycosylation. Influence of acceptor peptides on cotranslational glycosylation of yeast invertase and site-directed mutagenesis around a sequon sequence. *Eur. J. Biochem.* **181**:525-529.
 - **Rothman, J. E.** 1981. The golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science.* **213**:1212-1219.
 - **Rothman, J. E.** 1994. Mechanism of intracellular protein transport. *Nature.* **372**:55-63.
 - **Sakamoto, N., N. Enomoto, M. Kurosaki, F. Marumo, and C. Sato.** 1994. Sequential Change of the Hypervariable Region of the Hepatitis C Virus Genome in Acute Infection. *J Med Virol.* **42**:103-108.

-
- **Sansonno, D., and F. Dammacco.** 1993. Hepatitis C virus c100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection. *Hepatology*. **18**:240-245.
 - **Santolini, E., G. Migliaccio, and N. Lamonica.** 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*. **68**:3631-3641.
 - **Santolini, E., G. Migliaccio, and N. Lamonica.** 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*. **68**:3631-3641.
 - **Schindler, R., C. Itin, M. Zerial, F. Lottspeich, and H. P. Hauri.** 1993. ERGIC-53, a membrane protein of the ER-golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur. J. Cell. Biol.* **61**:1-9.
 - **Schreiber, G. B., M. P. Busch, S. H. Kleinmann, and J. J. Korelitz.** 1996. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N. Engl. J. Med.* **334**:1685-1690.
 - **Schroder, S., F. Schimmoller, B. Singer-Kruger, and H. Riezman.** 1995. The golgi-localisation of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1 mutation in α -COP. *J. Cell Biol.* **131**:895-912.
 - **Schutzbach, J. S., J. W. Jensen, C. S. Lue, and J. Monti.** 1987. Membrane structure and manosyl transferase activities: the effects of dolichols on membranes. *Chem. Scr.* **27**:109.
 - **Schutze, M. P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson.** 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type-II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**:1696-1705.
 - **Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton.** 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology*. **204**:114-122.
 - **Shah, H. A., W. Jafri, I. Malik, L. Prescott, and P. Simmonds.** 1997. Hepatitis C virus (HCV) genotypes and chronic liver disease in Pakistan. *J Gastroenterol Hepatol.* **12**:758-61.
 - **Shakin-Eshleman, S. H., A. T. Remaley, J. R. Eshleman, W. H. Wunner, and S. L. Spitalnik.** 1992. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **267**:10690-10698.
 - **Shakin-Eshleman, S. H., S. L. Spitalnik, and L. Kasturi.** 1996. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J. Biol. Chem.* **271**:6363-6366.
 - **Sheares, B. T.** 1988. Site-specific glycosylation in animal cells. Substitution of glutamine for asparagine 293 in chicken ovalbumin does not allow glycosylation of asparagine 312. *J. Biol. Chem.* **263**:12778-12782.
 - **Shih, C. M., S. C. J. Lo, T. Miyamura, S. Y. Chen, and Y. H. W. Lee.** 1993. Suppression of Hepatitis-B Virus Expression and Replication by Hepatitis-C Virus Core Protein in HuH-7 Cells. *J Virol.* **67**:5823-5832.
 - **Shimizu, Y., K. Yamaji, Y. Masuho, T. Yokota, H. Inoue, K. Sudo, S. Satoh, and K. Shimotohno.** 1996. Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease. *J Virol.* **70**:127-32.

-
- Shimizu, Y. K., M. Hijikata, A. Iwamoto, H. J. Alter, R. H. Purcell, and H. Yoshikura. 1994. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralisation escape mutant viruses. *J. Virol.* **68**:1494-1500.
 - Shimizu, Y. K., H. Igarashi, T. Kanematu, K. Fujiwara, D. C. Wong, R. H. Purcell, and H. Yoshikura. 1997. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol.* **71**:5769-73.
 - Shimizu, Y. K., A. J. Weiner, J. Rosenblatt, D. C. Wong, M. Shapiro, T. Popkin, M. Houghton, H. J. Alter, and R. H. Purcell. 1990. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:6441-4.
 - Shiratori, Y., N. Kato, O. Yokosuka, F. Imazeki, E. Hashimoto, N. Hayashi, A. Nakamura, M. Asada, H. Kuroda, N. Tanaka, Y. Arakawa, and M. Omata. 1997. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. *Gastroenterology.* **113**:558-66.
 - Shiyani, S. D., and N. V. Bovin. 1997. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J.* **14**:631-8.
 - Silini, E., F. Bono, A. Cividini, A. Cerino, S. Bruno, S. Rossi, G. Belloni, B. Brugnetti, E. Civardi, L. Salvaneschi, and a. I. et. 1995. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology.* **21**:285-90.
 - Silini, E., F. Bono, A. Cividini, A. Cerino, A. Maccabruni, C. Tinelli, S. Bruno, A. Bellobuono, and M. Mondelli. 1995. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol.* **22**:691-5.
 - Silverman, A. L., J. E. Puccio, G. W. Kulesza, D. G. McCray, and S. C. Gordon. 1994. HCV RNA is present in the menstrual blood of women with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol.* **89**:1201-2.
 - Silverman, N. S., M. Snyder, R. L. Hodinka, P. McGillen, and G. Knee. 1995. Detection of hepatitis C virus antibodies and specific hepatitis C virus ribonucleic acid sequences in cord bloods from a heterogeneous prenatal population. *Am J Obstet Gynecol.* **173**:1396-400.
 - Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. Mcomish, B. Irvine, E. Beall, P. L. Yap, J. Kolberg, and M. S. Urdea. 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**:2391-2399.
 - Sitia, R., M. Neuberger, C. Alberini, P. Bet, A. Fra, C. Valetti, G. Williams, and C. Milstein. 1990. Developmental regulation of IgM secretion: the role of the carboxy-terminal cysteine. *Cell.* **60**:781-790.
 - Sizova, D. V., V. G. Kolupaeva, T. V. Pestova, I. N. Shatsky, and C. U. Hellen. 1998. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol.* **72**:4775-82.
 - Sjoblom, I., M. Lundstrom, J. E. Sjogren, J. C. Glorioso, S. Jeansson, and S. Olofsson. 1987. Demonstration and mapping of highly carbohydrate-dependent epitopes in the herpes simplex virus type 1-specified glycoprotein C. *J Gen Virol*:545-54.

-
- Sjolander, S., A. Bolmstedt, L. Akerblom, P. Horal, S. Olofsson, B. Morein, and A. Sjolander. 1996. N-linked glycans in the CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160 are essential for the in vivo priming of T cells recognizing an epitope located in their vicinity. *Virology*. **215**:124-33.
 - Smith, D. B., S. Pathirana, F. Davidson, E. Lawlor, J. Power, P. L. Yap, and P. Simmonds. 1997. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol*. **78**:321-328.
 - Smith, S., and G. Blobel. 1993. The first transmembrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol*. **120**:631-637.
 - Soni, P. N., D. R. Tait, D. G. Kenoyer, C. F. Fernandes, S. Naicker, W. Gopaul, and A. E. Simjee. 1993. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in a South African area endemic for hepatitis B virus. *J Med Virol*. **40**:65-8.
 - Soto, B., L. Rodrigo, B. M. Garcia, Q. A. Sanchez, S. Riestra, J. I. Arenas, J. Andreu, M. Rodriguez, J. I. Emparanza, Y. Torres, and a. I. et. 1994. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case. A multicentre study of 423 pairings. *J Intern Med*. **236**:515-9.
 - Squadrito, G., F. Leone, M. Sartori, B. Nalpas, P. Berthelot, G. Raimondo, S. Pol, and C. Brechot. 1997. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology*. **113**:567-72.
 - Staneloni, R. J., and L. F. Leloir. 1982. The biosynthetic pathway of the asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem*. **12**.
 - Stanley, P., and E. Loffe. 1995. Glycosyltransferase mutants: key to new insights in glycobiology. *FASEB J*. **9**.
 - Stenflo, J., and P. Fernlund. 1982. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J Biol Chem*. **257**:12180-90.
 - Stibler, H., U. Stephani, and U. Kutsch. 1995. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome--a fourth subtype. *Neuropediatrics*. **26**:235-237.
 - Suzuki, R., Y. Matsuura, T. Suzuki, A. Ando, J. Chiba, S. Harada, I. Saito, and T. Miyamura. 1995. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol*. **76**:53-61.
 - Tabor, E., R. J. Gerety, J. A. Drucker, L. B. Seef, J. H. Hoofnagle, D. R. Jackson, M. April, L. F. Barker, and G. Pineda-Tamondong. 1978. Transmission of non-A, non-B hepatitis from a man to a chimpanzee. *The Lancet*. **1**:463-466.
 - Tai, C. L., W. K. Chi, D. S. Chen, and L. H. Hwang. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*. **70**:8477-84.
 - Takada, N., S. Takase, A. Takada, and T. Date. 1992. HCV Genotypes in Different Countries. *Lancet*. **339**:808.
 - Takagi, H., K. Takehara, R. Shimoda, S. Kakizaki, H. Takayama, T. Abe, T. Yamada, Y. Hashimoto, S. Saitoh, T. Matsumoto, A. Kojima, J. Takezawa, K. Yuasa, M. Moriguchi, T.

- Sekiguchi, T. Nagamine, and M. Mori. 1997. Prediction of effect of interferon on chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* **42**:2270-6.
- Takahashi, K., S. Kishimoto, H. Yoshizawa, H. Okamoto, A. Yoshikawa, and S. Mishiro. 1992. p26-Protein and 33-nm Particle Associated with Nucleocapsid of Hepatitis-C Virus Recovered from the Circulation of Infected Hosts. *Virology.* **191**:431-434.
- Tan, J., J. Dunn, J. Jaeken, and H. Schachter. 1996. Mutation in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficiency glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am. J. Hum. Genet.* **59**:810-817.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotoho. 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol.* **70**:3307-3312.
- Tanaka, T., N. Kato, Y. Nakagawa, Y. Ootsuyama, M. J. Cho, T. Nakazawa, M. Hijikata, Y. Ishimura, and K. Shimotoho. 1992. Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier: sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Res.* **23**:39-53.
- Taniguchi, S., H. Okamoto, M. Sakamoto, M. Kojima, F. Tsuda, T. Tanaka, E. Munekata, E. E. Muchmore, D. A. Peterson, and S. Mishiro. 1993. A Structurally Flexible and Antigenically Variable N-Terminal Domain of the Hepatitis-C Virus E2/NS1 Protein - Implication for an Escape from Antibody. *Virology.* **195**:297-301.
- Thomas, D. B., J. Hodgson, P. F. Riska, and C. M. Graham. 1990. The role of the endoplasmic reticulum in antigen processing. N- glycosylation of influenza hemagglutinin abrogates CD4+ cytotoxic T cell recognition of endogenously processed antigen. *J Immunol.* **144**:2789-94.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.
- Tomei, L., C. Failla, E. Santolini, R. DeFrancesco, and N. Lamonica. 1993. NS3 Is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis-C Virus Polyprotein. *J Virol.* **67**:4017-4026.
- Townsley, F. M., D. Wilson, and H. R. Pelham. 1993. Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* **12**:2821-2829.
- Troisi, C. L., F. B. Hollinger, W. K. Hoots, C. Contant, J. Gill, M. Ragni, R. Parmley, C. Sexauer, E. Gomperts, G. Buchanan, and a. l. et. 1993. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood.* **81**:412-8.
- Trowbridge, R., and E. J. Gowans. 1998. Identification of novel sequences at the 5' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Viral Hepat.* **5**:95-8.
- Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto, and K. Shimotoho. 1997. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol.* **71**:6720-6.
- Tsukiyamakohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal Ribosome Entry Site Within Hepatitis-C Virus RNA. *J Virol.* **66**:1476-1483.

-
- **Urdea, M. S., T. Horn, and T. J. Fultz.** 1991. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucl. Acid Res. Symposium Series.* **24**:197-200.
 - **Urge, L., L. Gorbics, and L. J. Otvos.** 1992. Chemical glycosylation of peptide T at natural and artificial glycosylation sites stabilizes or rearranges the dominant reverse turn structure. *Biochem Biophys Res Commun.* **184**:1125-32.
 - **Van Ameijden, E. J., J. A. Van den Hoek, G. H. Mientjes, and R. A. Coutinho.** 1993. A longitudinal study on the incidence and transmission patterns of HIV, HBV and HCV infection among drug users in Amsterdam. *Eur J Epidemiol.* **9**:255-62.
 - **Vandoorn, L. J., I. Capriles, G. Maertens, R. Deleys, K. Murray, T. Kos, H. Schellekens, and W. Quint.** 1995. Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *J Virol.* **69**:773-778.
 - **Verbaan, H., K. Andersson, and S. Eriksson.** 1993. Intravenous drug abuse--the major route of hepatitis C virus transmission among alcohol-dependent individuals? *Scand J Gastroenterol.* **28**:714-8.
 - **Viazov, S., S. Kuzin, N. Paladi, M. Tchernovetsky, E. Isaeva, L. Mazhul, F. Vasychova, A. Widell, and M. Roggendorf.** 1997. Hepatitis C virus genotypes in different regions of the former Soviet Union (Russia, Belarus, Moldova, and Uzbekistan). *J Med Virol.* **53**:36-40.
 - **Vince, A., D. Palmovic, N. Kutela, Z. Sonicky, T. Jeren, and M. Radovani.** 1998. HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia [In Process Citation]. *Infection.* **26**:173-7.
 - **Von Heijne, G.** 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**:4683-4690.
 - **Wada, I., S. Imai, M. Kai, F. Sakane, and H. Kanoh.** 1995. Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J. Biol. Chem.* **270**:20298-20304.
 - **Wagner, N., and H. W. Rotthauwe.** 1994. Hepatitis C contributes to liver disease in children and adolescents with hemophilia. *Klin Padiatr.* **206**:40-4.
 - **Wang, C. Y., P. Sarnow, and A. Siddiqui.** 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, Y. F., B. Brotman, L. Andrus, and A. M. Prince.** 1996. Immune response to epitopes of hepatitis C virus (HCV) structural proteins in HCV-infected humans and chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **173**:808-821.
 - **Weiner, A. J., M. J. Brauer, J. Rosenblatt, K. H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q. L. Choo, M. Houghton, and a. I. et.** 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**:842-8.
 - **Weiner, A. J., C. Christopherson, J. E. Hall, F. Bonino, G. Saracco, M. R. Brunetto, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, S. Venkatakrisna, T. Miyamura, J. Mchutchinson, T. Cuyppers, and M. Houghton.** 1991. Sequence Variation in Hepatitis-C Viral Isolates. *J Hepatol.* **13**:S6-S14.

-
- **Weiner, A. J., H. M. Geysen, C. Christopherson, J. E. Hall, T. J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, M. Brunetto, P. J. Barr, T. Miyamura, J. Mchutchinson, and M. Houghton.** 1992. Evidence for Immune Selection of Hepatitis-C Virus (HCV) Putative Envelope Glycoprotein Variants - Potential Role in Chronic HCV Infections. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89:**3468-3472.
 - **Weiner, A. J., G. Kuo, D. W. Bradley, F. Bonino, G. Saracco, C. Lee, J. Rosenblatt, Q. L. Choo, and M. Houghton.** 1990. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis [see comments]. *Lancet.* **335:**1-3.
 - **Weiner, A. J., M. M. Thaler, K. Crawford, K. Ching, J. Kansopon, D. Y. Chien, J. E. Hall, F. Hu, and M. Houghton.** 1993. A Unique, Predominant Hepatitis-C Virus Variant Found in an Infant Born to a Mother with Multiple Variants. *J Virol.* **67:**4365-4368.
 - **Weisz, O. A., A. M. Swift, and C. E. Machamer.** 1993. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J Cell Biol.* **122:**1185-96.
 - **Wojczyk, B. S., W. M. Stwora, E. S. Shakin, W. H. Wunner, and S. L. Spitalnik.** 1998. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. *Glycobiology.* **8:**121-30.
 - **Woodfield, D. G., M. Harness, and T. K. Rix.** 1993. Hepatitis C virus infections in oral and injectable drug users. *N Z Med J.* **106:**332-4.
 - **Wu, C. H., M. F. Lee, and H. S. Kuo.** 1997. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors in Taiwan [see comments]. *J Gastroenterol Hepatol.* **12:**625-8.
 - **Yamada, K., A. Mori, M. Seki, J. Kimura, S. Yuasa, Y. Matsuura, and T. Miyamura.** 1998. Critical point mutations for hepatitis C virus NS3 proteinase [In Process Citation]. *Virology.* **246:**104-12.
 - **Yamamoto, C., N. Enomoto, M. Kurosaki, S. H. Yu, J. Tazawa, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato.** 1997. Nucleotide sequence variations in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus-1b: no association with efficacy of interferon therapy or serum HCV-RNA levels. *Hepatology.* **26:**1616-20.
 - **Yamashita, K., A. Hitoi, N. Tateishi, T. Higashi, Y. Sakamoto, and A. Kobata.** 1985. The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **240:**573-582.
 - **Yan, Y., Y. Li, S. Munshi, V. Sardana, J. L. Cole, M. Sardana, C. Steinkuehler, L. Tomei, F. R. De, L. C. Kuo, and Z. Chen.** 1998. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* **7:**837-47.
 - **Yanagi, M., R. H. Purcell, S. U. Emerson, and J. Bukh.** 1997. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94:**8738-43.
 - **Yanez, E., T. A. Carmona, M. Tiemblo, A. Jimenez, and L. M. Fernandez.** 1998. Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem J:*65-71.

-
- Yao, N., T. Hesson, M. Cable, Z. Hong, A. D. Kwong, H. V. Le, and P. C. Weber. 1997. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.* **4**:463-467.
 - Yasui, K., T. Wakita, K. K. Tsukiyama, S. I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J. R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* **72**:6048-55.
 - Yen, J. H., S. C. Chang, C. R. Hu, S. C. Chu, S. S. Lin, Y. S. Hsieh, and M. F. Chang. 1995. Cellular proteins specifically bind to the 5'-noncoding region of hepatitis c virus RNA. *Virology.* **208**:723-732.
 - Yi, M., Y. Nakamoto, S. Kaneko, T. Yamashita, and S. Murakami. 1997. Delineation of regions important for heterodimeric association of hepatitis c virus E1 and E2. *virology.* **231**:119-129.
 - Yoo, B. J., R. R. Spaete, A. P. Geballe, M. Selby, M. Houghton, and J. H. Han. 1992. 5' End-Dependent Translation Initiation of Hepatitis-C Viral RNA and the Presence of Putative Positive and Negative Translational Control Elements Within the 5' Untranslated Region. *Virology.* **191**:889-899.
 - Yoshiba, M., K. Dehara, K. Inoue, H. Okamoto, and M. Mayumi. 1994. Contribution of Hepatitis C Virus to Non-A, Non-B Fulminant Hepatitis in Japan. *Hepatology.* **19**:829-835.
 - Yoshima, H., A. Matsumoto, T. Mizuochi, T. Kawasaki, and A. Kobata. 1981. Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha 1-acid glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **256**:8476-8484.
 - Yu, M. Y., B. L. Mason, and D. L. Tanmokersley. 1994. Detection and characterisation of hepatitis C virus RNA in immune globulines. *Transfusion.* **34**:596-602.
 - Yuasa, T., G. Ishikawa, S. Manabe, S. Sekiguchi, K. Takeuchi, and T. Miyamura. 1991. The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *J Gen Virol*:2021-4.
 - Zeuzem, S., J. H. Lee, and W. K. Roth. 1997. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology.* **25**:740-744.
 - Zhu, A., Z. K. Wang, and R. Beavis. 1998. Structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase: effect of glycosylation on the level of expression, secretion efficiency, and enzyme activity. *Arch Biochem Biophys.* **352**:1-8.
 - Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M. M. Lai. 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol.* **72**:3691-7.
 - Zibert, A., P. Dudziak, E. Schreier, and M. Roggendorf. 1997. Characterization of antibody response to hepatitis C virus protein E2 and significance of hypervariable region 1-specific antibodies in viral neutralization. *Arch Virol.* **142**:523-34.
 - Zibert, A., E. Schreier, and M. Roggendorf. 1995. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis c virus can block viral attachment. *Virology.* **208**:653-661.
 - Zignego, A. L., M. Foschi, G. Laffi, M. Monti, G. Careccia, R. G. Romanelli, M. E. De, R. Mazzanti, G. Buzzelli, V. G. La, and a. l. et. 1994. "Inapparent" hepatitis B virus infection and

hepatitis C virus replication in alcoholic subjects with and without liver disease. *Hepatology*. **19**:577-82.

