

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° attribué par la bibliothèque

THESE

soutenue par

Amélie CHOUKHI

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé



**ETUDE DU REPLIEMENT ET DE L'ASSEMBLAGE DES
GLYCOPROTEINES DU VIRUS DE L'HEPATITE C**

Présenté le 23 juin 1999, devant la commission d'examen:

Président: Professeur René CACAN

Rapporteurs: Docteur Annie CAHOUR
Docteur François PENIN

Examineurs: Professeur Geneviève SPIK
Professeur Christian BRECHOT

Directeur de thèse: Docteur Jean DUBUISSON

RESUME

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un agent infectieux qui pose un problème majeur de santé publique. Aucun vaccin n'existe à l'heure actuelle et l'étude du VHC est rendue difficile, notamment car il n'existe pas de système de culture cellulaire capable de multiplier ce virus de façon efficace.

Dans ce travail, nous avons entrepris l'étude du repliement et de l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe du VHC au sein du réticulum endoplasmique, en exprimant ces protéines à l'aide du virus de la vaccine. Il a été montré précédemment que les glycoprotéines E1 et E2 du VHC s'assemblent en complexes de deux types: le premier type correspond à des agrégats hétérogènes composés par les glycoprotéines liées entre elles par des ponts disulfures; et le second type est un hétérodimère de E1 et E2 stabilisé par des interactions non covalentes, qui est supposé être le complexe natif. Il apparaît que l'assemblage de ce complexe natif soit lent et inefficace, quelque soit le système d'expression utilisé. Au cours de notre étude, nous avons voulu comprendre l'origine de cette tendance à l'agrégation des glycoprotéines du VHC, afin de pouvoir améliorer l'efficacité de repliement du complexe E1E2 natif.

Dans un premier temps, nous avons montré la participation des chaperons BiP, calnexine et calréticuline dans le repliement assisté des glycoprotéines E1 et E2 du VHC. Il apparaît que les chaperons BiP et calréticuline interagissent avec les glycoprotéines du VHC engagées dans la voie non productive de formation des agrégats, et que la calnexine s'associe aux hétérodimères non covalents engagés dans la voie productive d'assemblage des complexes natifs. Dans ce cadre, la calnexine semble participer à certaines étapes cruciales du repliement des glycoprotéines E1 et E2 du VHC, tel que de la formation des ponts disulfures intramoléculaires, préalablement à leur assemblage en complexes natifs. La surexpression de ces différents chaperons n'a pas permis d'augmenter l'efficacité de repliement des glycoprotéines virales, suggérant la nécessité d'un équilibre de l'activité des ces protéines pour un repliement optimal des glycoprotéines du VHC.

La seconde partie de notre travail a porté sur la caractérisation des agrégats formés par les glycoprotéines du VHC, à l'aide d'un anticorps monoclonal produit dans le laboratoire. Nous avons pu montrer que les agrégats se forment rapidement et se dégradent très lentement dans les cellules qui les expriment. De plus, nous avons constaté des variations dans le niveau d'expression des agrégats au sein des cellules infectées. Enfin, de façon inattendue, nous avons mis en évidence le partage d'un épitope commun entre les agrégats glycoprotéiques du VHC et une protéine cellulaire. Cette dernière observation suggère que les agrégats du VHC pourraient être à l'origine de la production d'autoanticorps chez les patients infectés par le VHC, et que la tendance à l'agrégation des glycoprotéines pourrait être une propriété intrinsèque du virus.

Un des buts à long terme de l'étude du repliement et de l'assemblage des glycoprotéines du VHC est de pouvoir améliorer l'efficacité de repliement du complexe E1E2 natif, avec pour objectif de pouvoir l'utiliser dans des essais vaccinaux.

ABBREVIATIONS

aa	: acide aminé
Ac Mn	: anticorps monoclonal
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ALLN	: N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal
ALT	: alanine aminotransférase
AMP	: Adénosine monophosphate
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
BiP	: Binding immunoglobulin Protein
BVDV	: Bovine viral diarrhea virus
CD4	: Cluster differentiation 4
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CMH I	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CNX	: calnexine
CST	: castanospermine
CRT	: calréticuline
C-terminal	: carboxy-terminal
CyPB	: Cyclophiline B
DTT	: Dithiothréitol
eIF	: eucaryotic Initiation Factor
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbant assay
endo H	: Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H
ERAD	: Endoplasmic <i>Reticulum</i> -associated degradation
ERGIC	: Endoplasmic <i>Reticulum</i> Golgi Intermediate Compartment
ERp	: Endoplasmic <i>Reticulum</i> -resided protein
Glc	: Glucose
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
grp	: glucose -regulated protein
GTP	: guanosine triphosphate
Hsp	: Heat shock protein
HVR	: Hypervariable region
IFN	: Interféron
IRES	: Internal Ribosome Entry Site
ISDR	: Interferon Sensitivity Determining Region
kDa	: kiloDalton
LKM	: Liver/Kidney microsomal (antibodies)
M2BP	: Mac-2 Binding Protein
Man	: Mannose
NB-DNJ	: N-butyl déoxinojirimycine
NC	: non-codant
NS	: non-structural
N-terminal	: amino-terminal
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBMC	: cellules mononuclées du sang périphérique
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDI	: Protéine Disulfide Isomérase
PKR	: protéine kinase dépendante de l'ARN bicaténaire
PNGase	: Peptide N-glycosidase
PPI	: Peptidyl Prolyl <i>cis-trans</i> Isomérase
PTB	: polypyrimidine tract-binding protein
RE(R)	: (rough) Endoplasmic <i>Reticulum</i>
RIBA	: Recombinant immunoblot assay

SDS	: sodium dodécyl sulfate
SRP	: Signal Recognition Particule
TCR	: T Cell Receptor
Th	: T helper (lymphocyte)
TRAM	: Translocating chain-associated membrane protein
UDP	: Uridine diphosphate
VHB	: Virus de l'hépatite B
VHC	: Virus de l'hépatite C
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	: Virus de la stomatite vésiculaire

Définition de certains termes utilisés:

- Ségrégation: correspond au terme "translocation". C'est le processus d'entrée d'une protéine en voie de synthèse du cytosol vers le RE.
- Rétro-transport: correspond au terme "retrotranslocation". Il s'agit du transport des protéines destinées à être dégradées du RE vers le cytosol.

Nomenclature des acides aminés:

Acide aspartique	Asp	D	Leucine	Leu	L
Acide glutamique	Glu	E	Lysine	Lys	K
Alanine	Ala	A	Méthionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phénylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

Anticorps utilisés:

ANTICORPS	TYPE	SPECIFICITE	PROVENANCE
Anti-BiP	Ac Mn	Anti-C-terminal de BiP (rat)	StressGen
Anti-calnexine	Ac Pol	Anti-C-terminal de CNX (chien)	StressGen
Anti-calréticuline	Ac Pol	Anti-C-terminal de CRT (homme)	Affinity Bioreagents
Anti-grp94	Ac Mn	Anti-grp94 (rat)	StressGen
Anti-PDI	Ac Pol	Anti-PDI (lapin)	StressGen
Anti-cyclophiline B	Ac Pol	Anti-cypB (homme)	G.Spik
A4	Ac Mn	Anti-E1 (conformation-indépendant)	H.Greenberg
A11 et H47	Ac Mn	Anti-E2 (conformation-indépendant)	H.Greenberg/J.Dubuisson
H2	Ac Mn	Anti-E2 (conformation-dépendant)	J.Dubuisson
H14	Ac Mn	Anti-E1, -E2 et -M2BP	J.Dubuisson
Anti-M2BP	Ac Pol	Anti-M2BP	R.Timpl

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Chapitre I: Généralités sur le virus de l'hépatite C (VHC).....1

A. Identification du virus de l'hépatite C.....	1
1. Mise en évidence d'un agent non-A, non-B.....	1
2. L'agent étiologique de l'hépatite C.....	1
B. Epidémiologie.....	2
1. Les modes de transmission du VHC.....	2
1.1. Transmission par voie parentérale.....	2
1.2. Transmission materno-foetale.....	4
1.3. Transmission par voie sexuelle.....	4
1.4. Transmission familiale.....	4
2. Prévention de l'hépatite C.....	5
C. Physiopathologie de l'hépatiteC.....	5
1. L'hépatite C aigüe.....	5
2. L'hépatite C chronique.....	5
3. La cirrhose.....	6
4. Le carcinome hépatocellulaire.....	6
5. Les maladies autoimmunes associées au VHC.....	7
D. Biologie moléculaire du VHC.....	8
1. Les extrémités non-codantes.....	8
1.1. L'extrémité 5' non-codante (5' NC).....	8
1.2. L'extrémité 3' non-codante (3' NC).....	10
2. Les protéines virales.....	10
2.1. Les protéines structurales.....	10
a. La protéine de capside.....	10
b. Les glycoprotéines E1 et E2.....	12
2.2. Le polypeptide p7.....	12
2.3. Les protéines non structurales.....	13
a. La protéine NS2.....	13
b. La protéine NS3.....	13
c. La protéine NS4A.....	14
d. La protéine NS4B.....	14
e. La protéine NS5A.....	15
f. La protéine NS5B.....	16
E. La molécule CD81, un récepteur potentiel pour le VHC ?.....	16
F. La variabilité génomique du VHC.....	17
1. Le géotypage.....	17
2. L'influence du géotype.....	18
2.1. Sur la maladie et son traitement.....	18
2.2. Sur le mode de transmission.....	19
G. Diagnostic de l'hépatite C.....	19
1. Diagnostic sérologique.....	19
2. Diagnostic par détection de l'ARN viral.....	20
H. La réponse immunitaire induite au cours des infections par le VHC .	21
1. La réponse immunitaire à médiation humorale.....	21

2. La réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	22
2.1. La réponse immunitaire de type auxiliaire (lymphocytes T CD4+)	23
2.2. La réponse immunitaire de type cytotoxique (lymphocytes T CD8+)	23
3. Conséquence de la réponse immunitaire cellulaire.....	24
I. Le traitement de l'hépatite C.....	25
J. Les difficultés et les espoirs liés à l'élaboration d'un vaccin.....	26
1. Les obstacles	27
2. Vers le vaccin	27

Chapitre II: Le réticulum endoplasmique rugueux (RER): lieu de ségrégation, de N-glycosylation, de repliement et d'assemblage des protéines

A. La ségrégation des protéines en voie de synthèse.....	30
1. L'adressage de la protéine synthétisée vers la membrane du RE.....	30
1.1. Le peptide signal	30
1.2. La protéine SRP.....	31
1.3. Les récepteurs du complexe ribosome-protéine-SRP.....	31
a. Le récepteur de la protéine SRP	31
b. Les récepteurs du ribosome.....	31
2. La ségrégation de la protéine à travers la membrane du RE	32
2.1. Le translocon	32
a. Le complexe Sec61	32
b. La protéine TRAM.....	32
2.2. Les mécanismes de la ségrégation	33
a. Cas des protéines sécrétées	33
b. Cas de protéines membranaires	33
c. Intervention de certains chaperons de la lumière du RER	34
B. La N-glycosylation des protéines.....	34
1. Le glycanne transféré.....	35
2. Le sequon.....	35
3. L'oligosaccharyltransférase	35
4. La maturation des N-glycosylprotéines	35
C. Le repliement et l'assemblage des glycoprotéines.....	36
1. Le repliement protéique	36
1.1. Qu'est-ce que le repliement d'une protéine ?	36
1.2. Le rôle des glycanes dans le repliement des glycoprotéines.....	36
1.3. Le rôle du contrôle de qualité.....	37
2. Le RE: un environnement favorable au repliement des protéines	38
2.1. La lumière de RE est un milieu oxydant.....	38
a. Le glutathion.....	38
b. La protéine Ero1p.....	38
2.2. La lumière du RE: lieu de stockage du calcium intracellulaire	39
3. Chaperons et foldases: acteurs potentiels du repliement des glycoprotéines dans le RE.....	40
3.1. Origine et principe d'action	40
3.2. Les foldases	41
3.2.1. Les protéines "PDI-like"	41
a. PDI.....	42
b. Erp72.....	43
c. Erp57	44
3.2.2. La peptidyl prolyl <i>cis-trans</i> isomérase (PPI).....	44
3.3. Les chaperons moléculaires.....	45
3.3.1. Les chaperons lectiniques.....	45
a. La calnexine.....	46

b. La calréticuline	47
c. Modèle interactif des chaperons lectiniques.....	48
* Les preuves d'une interactions exclusivement glycanique.....	48
* L'α- glucosidase I et l' α- glucosidase II.....	49
* L'UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase.....	50
* ERp57: un nouvel acteur du cycle de repliement des glycoprotéines	50
* Modèle de repliement des glycoprotéines	51
d. Les inhibiteurs de la maturation des glycannes comme agents anti-viraux.....	52
3.3.2. Les protéines de choc thermique.....	53
a. BiP.....	53
b. Grp94	55
4. L'assemblage des protéines en oligomères	55
4.1. Lieu d'assemblage des protéines.....	55
4.2. Le rôle des chaperons	56
4.3. La formation d'agrégats.....	56
D. La rétention des glycoprotéines dans le RE.....	57
1. La rétention des glycoprotéines par recyclage.....	58
a. Le motif KDEL.....	58
b. Le motif dilysine	58
c. Le motif double arginine	59
d. La rétention exercée par le contrôle de qualité	59
2. La rétention stricte des glycoprotéines	60
E. La dégradation des protéines mal repliées.....	60
- La dégradation est cytosolique	60
- L'exportation de la protéine à dégrader vers le cytosol.....	61
- Le protéasome, acteur de la dégradation des protéines	61

RESULTATS-DISCUSSION

Chapitre III: Le repliement et l'assemblage des glycoprotéines du VHC au sein du RE

A. Les glycoprotéines du VHC.....	63
B. La synthèse des glycoprotéines du VHC.....	63
1. La ségrégation des glycoprotéines du VHC.....	63
2. Les glycoprotéines du VHC sont membranaires	64
3. Les glycoprotéines du VHC sont N-glycosylées	64
a. Les sites potentiels de N-glycosylation des glycoprotéines E1 et E2	65
b. Les N-glycannes des glycoprotéines du VHC sont de type oligomannosidiques.....	65
C. l'assemblage des glycoprotéines du VHC.....	66
1. La formation de complexes E1E2 natifs.....	66
2. Les séquences impliquées dans l'association des glycoprotéines E1 et E2 en hétérodimères.....	67
3. La formation d'agrégats.....	68
D. La localisation subcellulaire des glycoprotéines du VHC.....	68
E. Le repliement des glycoprotéines du VHC.....	69
1. La formation des ponts disulfures intramoléculaires	69

2. Le repliement de E1 est dépendant de la coexpression de E2.....	70
3. Le rôle des chaperons dans le repliement des glycoprotéines E1 et E2 du VHC.....	71

ARTICLE I

Discussion de l'article: "Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C virus glycoproteins"

I. Introduction.....	72
II. Identification des chaperons qui interagissent avec les glycoprotéines du VHC.....	72
1. Les chaperons BiP, CNX et CRT interagissent avec les glycoprotéines du VHC.....	72
2. Chacune des glycoprotéines du VHC interagit avec les chaperons BiP, CNX et CRT.....	73
III. Modalités d'interaction des chaperons BiP, CNX et CRT avec les glycoprotéines du VHC.....	73
1. L'interaction du chaperon BiP est modulé par l'ATP.....	73
2. Les interactions avec les chaperons CNX et CRT sont dépendantes des glycannes.....	74
IV. Implication des chaperons BiP, CNX et CRT dans les deux voies d'assemblage des glycoprotéines du VHC.....	75
1. Analyse de l'état conformationnel des glycoprotéines du VHC en interaction avec les chaperons BiP, CNX et CRT.....	75
2. Cinétique d'association-dissociation des glycoprotéines du VHC avec les chaperons BiP, CNX et CRT.....	76
V. La surexpression des chaperons BiP, CNX et CRT ne permet pas d'augmenter le rendement de formation des complexes natifs....	77
VI. Conclusion.....	78

4. L'agrégation des glycoprotéines du VHC, une propriété intrinsèque du virus?	79
--	----

ARTICLE II

Discussion de l'article "Characterization of Aggregates of Hepatitis C virus Glycoproteins"

I. Introduction.....	80
II. Spécificité de reconnaissance par l'Ac Mn H14.....	80
A. L'Ac Mn H14 précipite les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC	80
B. L'Ac Mn H14 reconnaît une protéine cellulaire.....	81
III. Caractérisation de l'épitope reconnu par l'anticorps H14.....	81
A. L'AC Mn H14 reconnaît un épitope accessible sur la forme immature de M2BP.....	81

B. L'épitope reconnu par l'Ac Mn H14 est présent sur les agrégats des glycoprotéines du VHC	82
1. Nature de l'épitope reconnu sur les agrégats	82
2. Rôle des domaines transmembranaires des glycoprotéines du VHC dans la formation de l'épitope H14.....	82
3. Cinétique d'apparition et de dégradation des agrégats.....	83
IV. Localisation et répartition des agrégats dans les cellules infectées.....	83
V. Le rôle potentiel des agrégats lors de l'infection par le VHC....	84
1. Rôle potentiel des agrégats dans les maladies autoimmunes associées au VHC.....	84
2. Rôle potentiel d'anticorps anti-agrégats dans l'inhibition fonctionnelle de M2BP	84
VI. Conclusion.....	86

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	87
--	-----------

BIBLIOGRAPHIE.....	91
---------------------------	-----------

INTRODUCTION

Chapitre I: Généralités sur le virus de l'hépatite C(VHC)

A . Identification du virus de l'hépatite C

1. Mise en évidence d'un agent non-A, non-B

Durant les années 70, l'identification des virus de l'hépatite B (Blumberg, et al. 1965) et de l'hépatite A (Feinstone, et al. 1973) permirent la mise au point de tests diagnostic pour leur détection (Bradley, et al. 1979, Prince 1968). Néanmoins, l'utilisation de ces tests démontra que seulement 10% des hépatites post-transfusionnelles étaient dues à ces deux agents. La majorité des hépatites (90%) semblaient donc apparentées à un agent infectieux encore inconnu qui fut appelé virus non-A non-B. Dès lors, de nombreuses études furent entreprises afin de mettre en évidence des marqueurs sérologiques spécifiques de cet agent non-A non-B.

L'utilisation du chimpanzé, seul modèle animal connu, permit de démontrer dès 1978 l'existence d'un agent transmissible responsable des hépatites post-transfusionnelles non-A non-B (Alter, et al. 1978, Tabor, et al. 1978). La sensibilité de ce virus au chloroforme suggéra qu'il était enveloppé, et une taille de 30 à 80 nm lui fut attribuée grâce à des études d'ultrafiltration (Bradley, et al. 1985, He, et al. 1987).

Néanmoins, deux obstacles se sont présentés à l'étude plus approfondie de ce virus:

- il n'existait pas (et c'est encore vrai aujourd'hui) de système de culture cellulaire capable de le multiplier de façon efficace,
- le titre infectieux dans les sérums de chimpanzés infectés est beaucoup trop faible, notamment pour l'extraction d'une quantité de matériel suffisante indispensable à la détection par des technologies classiques d'hybridation.

2. L'agent étiologique de l'hépatite C

Il fallut attendre 1989 pour que ce virus soit enfin caractérisé par le groupe de Houghton, en collaboration avec l'équipe de Bradley (Figure 11, Choo, et al. 1989). Avec des techniques de biologie moléculaire qui furent utilisées pour la première fois dans le domaine de la virologie, le génome viral a pu être identifié par clonage, sans isolement préalable de la particule virale.

Sur base de son organisation génomique, analogue à celle du virus de la fièvre jaune (genre flavivirus) et à celle du virus de la peste porcine classique (genre Pestivirus), le virus de l'hépatite C (VHC) fut classé dans la famille des *Flaviviridae*, sous le genre hépacivirus (Figure 1, Miller and Purcell, 1990). Plus récemment, le VHC fut visualisé par immuno-microscopie électronique à partir de plasma humain. Il se présenterait sous la forme d'une particule sphérique d'environ 60 nm de diamètre avec des spicules en surface (Kaito, et al. 1994).

B. Epidémiologie

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un agent étiologique qui pose un problème majeur de santé publique puisqu'environ 175 millions de personnes seraient infectées à travers le monde (Houghton 1996). En France, une personne sur cent serait infectée, ce qui correspond à environ 600 000 cas (Conférence de consensus, Paris, 1997).

La séroprévalence de l'hépatite C varie en fonction des pays. Cependant, même si elle reste faible dans le nord de l'Europe et aux Etats-Unis (entre 0,8 et 1,5%), elle devient très préoccupante dans des pays comme l'Afrique centrale ou l'Egypte où elle atteint 14,5% de la population (Van der Poel, et al. 1994).

1. Les modes de transmission du VHC

Il semble que la transmission du VHC se fasse essentiellement par voie parentérale et particulièrement par transfusion sanguine. D'autres voies de transmission ont aussi été décrites (voir paragraphes suivants), mais l'inquiétude réside par le fait qu'environ 40% des hépatites sont sporadiques.

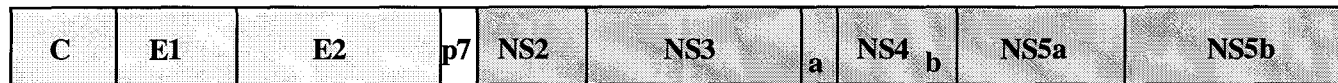
1.1. Transmission par voie parentérale

Lorsqu'aucun test de dépistage du VHC n'était encore disponible, 10 à 20% des individus ayant reçu des produits sanguins étaient infectés par ce virus.

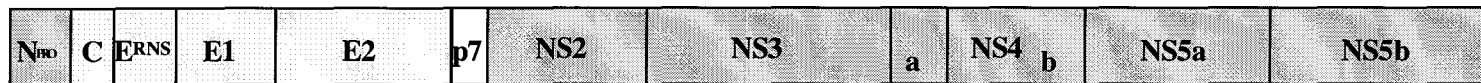
Heureusement, le développement de ces tests (dépistage des Ac anti-VHC obligatoire depuis le 1er mars 1990) ainsi que le traitement systématique des lots sanguins par voie chimique ou thermique, ont pratiquement fait disparaître les risques liés à la transfusion sanguine. Par conséquent, la transfusion de sang ne représente plus actuellement de risque important. En effet, le risque résiduel est très faible, puisqu'il est de l'ordre de 1/200 000 dons en France (Conférence de consensus à Paris, 1997).

Figure 1: Les trois genres de la famille des FLAVIVIRIDAE (d'après Rice,1996).

HEPACIVIRUS



PESTIVIRUS



FLAVIVIRUS



 protéines structurales

 protéines non-structurales

Néanmoins, il est à noter que malgré les moyens de dépistage utilisés pour la détection du VHC le taux de contamination reste très élevé chez les hémophiles. On estime en effet actuellement qu'environ 76% d'entre eux sont porteurs du virus (Mauserbunschoten, et al. 1995, Morfini, et al. 1994, Troisi, et al. 1993, Wagner and Rotthauwe 1994). Des statistiques inquiétantes atteignent même 84 à 100% lorsque les procédures d'inactivation du virus dans les lots sanguins n'ont pas été respectées (Troisi, et al. 1993, Wagner and Rotthauwe 1994).

Une transmission par l'intermédiaire de produits sanguins chez des patients déficients en immunoglobulines et recevant des préparations d'anticorps par l'intermédiaire d'appareils d'hémodialyse a également été décrite (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 pour laquelle le risque de transmission semble corrélé avec la durée et la fréquence des dialyses (Bukh, et al. 1993a, Cassidy, et al. 1995, Dussol, et al. 1993, Lin, et al. 1993). Par conséquent, chez les transplantés rénaux, la prévalence de l'hépatite C est importante (environ 25% en France) en raison de la forte diffusion virale chez les dialysés ainsi que des protocoles de préparation à la greffe qui prévoient une transfusion sanguine. (Bang, et al. 1995, Genesca, et al. 1995).

Le risque nosocomial, éventuellement associé à certaines techniques médico-chirurgicales comportant une exposition au sang a progressivement diminué à partir des années 70. En 1996, les procédures de décontamination-désinfection des endoscopes ainsi que la stérilisation des pinces à biopsie ont été rendues obligatoires en France.

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 (Puro, et al. 1995).

Le principal facteur de risque de transmission du VHC en France est lié à l'utilisation de drogue par voie intraveineuse. Les prévalences apparaissent extrêmement élevées en raison du partage des seringues contaminées. En fonction des pays concernés, le taux de contamination varie entre 50 et 100% des individus (Fingerhood, et al. 1993, Mauserbunschoten, et al. 1995). On a pu estimer une prévalence variant de 70 à 92% en Europe et aux Etats-Unis (Esteban 1993).

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).

1.2. Transmission materno-foetale

De nombreux travaux ont cherché à mettre en évidence une transmission verticale du VHC, mais la variété des méthodes utilisées a rendu leur comparaison délicate (Roudot-Thoraval, et al. 1993). De plus, le mécanisme de cette transmission reste discuté (Nousbaum, et al. 1995). Néanmoins, il semble que la contamination materno-foetale survienne au cours de l'accouchement, soit au moment du travail, soit lors l'accouchement (Weiner, et al. 1993). En fait, il semble que le risque de transmission soit directement corrélé au titre en ARN viral dans le sérum de la mère (Ohto, et al. 1994). Ainsi, on estime entre 0 et 7% le risque de transmission périnatale du VHC (Kurauchi, et al. 1993, Moriya, et al. 1995, Silverman, et al. 1995). L'ensemble de ces données montrent que la transmission materno-foetale est assez rare mais elle peut expliquer certains cas d'hépatite chronique chez l'enfant.

1.3. Transmission par voie sexuelle

La possibilité d'une transmission par voie sexuelle du virus de l'hépatite C est très discutée, mais il semble qu'elle soit probable. En effet, des études montrent que le risque de transmission entre partenaires hétérosexuels existe bien, même si il reste relativement faible (Meisel, et al. 1995, Soto, et al. 1994). Cependant, le mode de contamination reste encore indéterminé, étant donné que le virus n'est détectable ni dans le sperme, ni dans les sécrétions vaginales (Chang, et al. 1994).

1.4. Transmission familiale

Une possibilité de transmission intrafamiliale du VHC a été évoquée, suite à la constatation d'une prévalence des anticorps anti-VHC significativement plus élevée dans les familles de patients atteints d'hépatite C (Everhart, et al. 1990, Kiyosawa, et al. 1994). Néanmoins, comme dans le cas de la transmission par voie sexuelle, le mécanisme de contamination reste inconnu. Il a cependant été avancé que pour ces deux voies de transmission, la propagation virale pouvait se produire par le biais de micro-effractions vasculaires ou épithéliales.

2. Prévention de l'hépatite C

En l'absence d'un traitement actif chez tous les malades, la prévention de l'infection par le VHC a un rôle majeur dans la lutte contre la maladie. L'utilisation de tests de diagnostic

systematiques sur les dons sanguins a permis d'éliminer la quasi totalité des risques de contamination provenant des donneurs de sang. De même, des précautions sont prises pour les dérivés sanguins ainsi que pour le matériel chirurgical et à dialyse, qui sont obligatoirement traités en conséquence. Chez les toxicomanes par voie intraveineuse, la prévention de la maladie passe par les campagnes de délivrance gratuite de seringues. Par contre, la prévention de la transmission par les autres voies (sexuelle, materno-foetale et familiale) est plus compliquée. En effet, comme nous venons de le voir, le risque de contamination par ces voies est difficile à évaluer et l'absence de marqueurs de l'infection ne permet pas d'identifier les sujets les plus contagieux. Enfin, aucune prévention ne peut être envisagée pour les hépatites sporadiques. Par conséquent, le meilleur moyen de prévenir l'hépatite C serait donc la vaccination.

C. Physiopathologie de l'hépatite C

L'infection par le virus de l'hépatite C est caractérisé par une prédominance des formes asymptomatiques ainsi qu'une évolution fréquente vers la chronicité. En effet, 50 à 75% des patients ayant fait une hépatite aigüe verront leur maladie évoluer vers une hépatite chronique (Figure 2). Les suites de cette évolution peuvent être dramatiques puisque 20% de ces sujets développeront une cirrhose qui peut dégénérer en carcinome hépato-cellulaire. De plus, des études montrent que l'apparition de lésions hépatiques est continue et que l'activité virale persiste même lors des phases critiques de cirrhose.

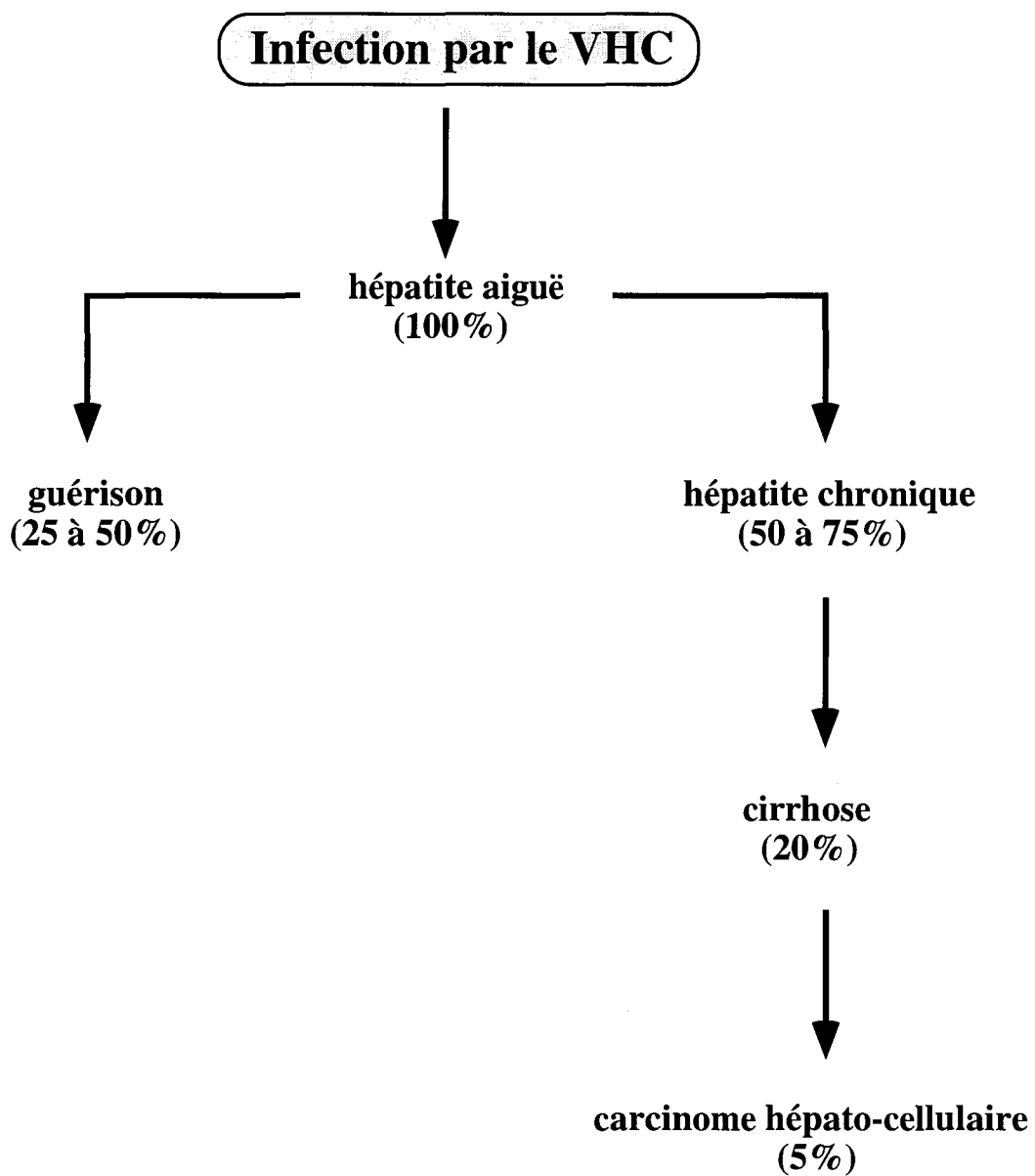
1. L'hépatite C aigüe

Une des particularités de l'hépatite C est la latence de 2 semaines à 6 mois entre la contamination virale et la survenue de l'hépatite aigüe. L'hépatite aigüe est asymptomatique dans deux tiers des cas, sinon, elle se manifeste par des signes cliniques comme une céphalée, une fièvre modérée, une asthénie intense ou encore un ictère dans environ un quart des cas. On peut également observer une élévation (d'importance variable d'un patient à l'autre) du taux sérologique des ALTs (alanine aminotransférases), caractéristique de la destruction des hépatocytes. Certaines hépatites fulminantes ont même été décrites, mais elles restent heureusement très rares (Yoshida, et al. 1994).

2. L'hépatite C chronique

Pour environ 75 % des cas, l'hépatite aigüe devient chronique et se traduit par une élévation des ALTs pendant plus de 6 mois après la primo-infection, avec une succession de

Figure 2 : Evolution clinique des infections par le VHC.



pics de ces enzymes au cours de la maladie. Bien que chez un certain nombre de sujets le taux d'ALTs se normalise, la virémie persiste (Di Bisceglie, et al. 1991), et le siège de l'activité virale se localise principalement au niveau des cellules hépatiques.

Cette maladie chronique peut persister toute la vie, avec une alternance de phases de quiescence et de phases d'activité. Alors que durant la phase de quiescence l'inflammation reste localisée à la région périportale, lors de la phase active, on observe l'apparition de nodules lymphoïdes, l'altération des canaux biliaires interlobulaires, l'infiltration de lymphocytes et la mise en place d'une fibrose. La biopsie hépatique est alors indispensable pour déterminer le stade évolutif de la maladie. Notamment, on utilise le score histologique de Knodell afin de définir le stade et l'activité de cette pathologie.

3. La cirrhose

Il a été estimé que 10 à 15 années étaient nécessaires entre l'infection par le VHC et le déclenchement de la cirrhose. Celle-ci se caractérise par une propagation de la nécrose inflammatoire du foie, dont l'arrêt total des fonctions est observé dans 20 à 25 % des cas. Les patients atteints devront alors recourir à une transplantation hépatique. Cependant, 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. En effet, même si le tropisme dominant du VHC est le foie, un certain nombre d'arguments suggèrent qu'il serait capable de se répliquer dans des cellules hématopoïétiques (Bouffard, et al. 1992, Muller, et al. 1993). Ces lymphocytes du sang périphériques (notamment cellules B et macrophages) peuvent donc probablement constituer des sites extra-hépatiques responsables de cette réinfection rapide post-opératoire (Lerat and Inchauspé 1997).

4. Le carcinome hépatocellulaire

Le potentiel évolutif d'une cirrhose est le carcinome hépatocellulaire qui survient dans environ 5 % des cas (Kiyosawa, et al. 1990). Il a été montré que les tumeurs hépatiques contenaient de l'ARN viral, cependant, l'effet carcinogène du virus est encore à l'étude. Aussi, aucune activité de transcriptase inverse n'a été mise en évidence chez le VHC, ce qui exclut toute intégration de son génome à celui de la cellule hôte.

Les cancers du foie qui surviennent suite à l'infection par le VHC sont généralement associés à une cirrhose préexistante. Néanmoins, différentes études tendent à mettre en cause certaines protéines virales. Ainsi, la partie N-terminale de la protéine NS3 aurait des propriétés transformantes *in vitro* sur les cellules NIH3T3. De même, il a été suggéré que la protéine C du VHC, qui semble capable de migrer vers le noyau, pourrait jouer un rôle dans la carcinogénèse

(Shih, et al. 1995). En effet, une équipe japonaise a rapporté le développement d'un carcinome hépatocellulaire chez deux lignées de souris transgéniques pour le gène de la protéine C (Moriya, et al. 1998). Ce résultat suggère que la protéine C joue un rôle important dans le développement du cancer du foie chez les individus atteints d'hépatite C chronique.

De nombreux autres facteurs semblent à l'origine de l'aggravation de la maladie. Parmi eux, on peut citer:

- Le génotype du virus (Di Bisceglie 1997, Donato, et al. 1997, Dusheiko, et al. 1994, Pozzato, et al. 1994).
- La contamination transfusionnelle, dont le pronostic est plus défavorable que pour les autres voies de transmission (Gordon, et al. 1993).
- La coinfection par le virus de l'hépatite B (Di Bisceglie 1997, Fong, et al. 1991).
- La consommation, même modérée, d'alcool (Di Bisceglie 1997, Mendenhall, et al. 1991).

5. Les maladies autoimmunes associées au VHC

L'infection chronique par le VHC semble associée à une pléthore de perturbations immunes et autoimmunes. Il s'ensuit une série d'affections diverses ainsi que la synthèse d'auto-anticorps, différents de ceux que l'on trouve chez des patients atteints d'hépatite autoimmune (Manns and Obermayer-Straub 1997).

L'affection la plus courante est la cryoglobulinémie mixte de type II, que l'on retrouve chez 50% des patients atteints d'hépatite C chronique (Ferri, et al. 1993, Lunel, et al. 1994). Cette pathologie se caractérise par une association d'immunoglobulines G polyclonales avec une immunoglobuline M monoclonale. Ces complexes immuns ainsi formés circulent dans le sang et ont la propriété de précipiter à une température inférieure à 37°C. Par conséquent, elle donne lieu à des complications cutanées, rénales, articulaires ou neurologiques. Les antigènes à l'origine de la production des cryoglobulines sont encore inconnus.

Des atteintes thyroïdiennes sont elles aussi associées à l'hépatite C, et il a même été suggéré que l'hypothyroïdisme en plus de certaines maladies comme l'arthrite, étaient dues en grande partie au traitement par l'interféron alpha (Pittau, et al. 1997).

D'autres associations pathologiques telles que la maladie de Gougerot-Sjögren (infiltration de lymphocytes dans les glandes salivaires), la porphyrie cutanée (Decastro, et al. 1993), le lichen plan, ou encore des maladies autoimmunes du foie (Koskinas, et al. 1994) ont pu être observées.

Parmi les causes de toutes ces maladies, il semble très probable que l'une d'entre elle soit la présence d'auto-anticorps dans le sang. En effet, des anticorps anti-noyau (ANA), anti-muscle-lisse, et anti-microsomes de foie et de rein (LKM= liver/kidney microsomal antibodies) ont pu être mis en évidence (Lunel, et al. 1992, Manns and Obermayer-Straub 1997). Ces

derniers (les LKM) reconnaissent des auto-épitopes aussi bien conformationnels que linéaires sur des protéines microsomales comme le cytochrome P450 2D6. En particulier, deux de ces protéines microsomales n'ont pas encore été identifiées, et seule leur masse moléculaire de 59 et 70 kDa a pu être déterminée (Manns and Obermayer-Straub 1997).

Il n'est pas impossible que le virus de l'hépatite C lui-même puisse effectuer un « mimétisme » de certains des épitopes reconnus par les auto-anticorps. Par conséquent, le VHC pourrait être à l'origine de ces auto-anticorps sinon de leur augmentation.

D. Biologie moléculaire du VHC

Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9 600 nucléotides (Choo, et al. 1991, Houghton, et al. 1991, Kolykhalov, et al. 1997). Cette molécule code une polyprotéine unique encadrée de deux régions non codantes aux extrémités 5' et 3'. Suivant le génotype concerné, la polyprotéine est constituée de 3 008 à 3 037 acides aminés (Chamberlain, et al. 1997). Cette polyprotéine est clivée de façon co- et post-traductionnelle par des protéases d'origine cellulaire et virale en dix protéines individuelles: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. C, E1 et E2 constituent les protéines structurales de la particule virale, et NS2-NS5B sont les protéines non-structurales dont une des fonctions principales est d'assurer la réplication de son génome. Il n'a pas encore été possible de classer la protéine p7 dont la fonction reste encore indéterminée. La figure 3 illustre l'organisation du génome du VHC.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le VHC appartient au genre hépacivirus et à la famille des *Flaviviridae* qui comprend deux autres genres: les flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de la dengue, ...) et les pestivirus (virus de la diarrhée bovine, ...) (Francki, et al. 1991). En effet, le profil d'hydrophobicité et l'organisation génomique de ces trois genres sont similaires (Figure 1).

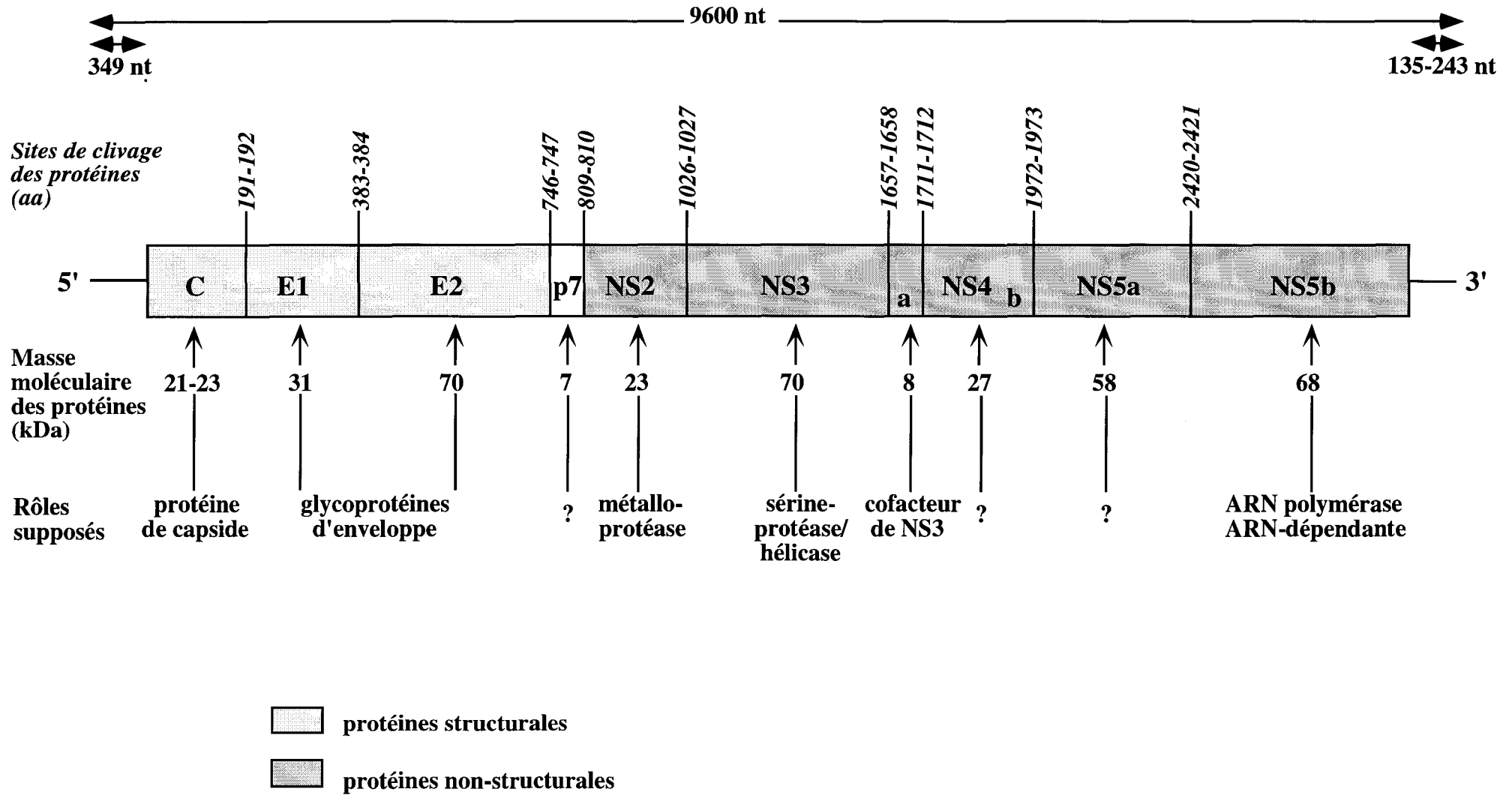
1. Les extrémités non codantes

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

La comparaison entre différents isolats viraux du VHC a permis d'établir que la région 5' NC est la plus conservée du génome viral (Bukh, et al. 1992a, Chen, et al. 1991). La longueur de sa séquence tout d'abord estimée à 341 nucléotides a été récemment remise en question. En effet, la découverte d'une séquence supplémentaire de huit nucléotides à son extrémité 5' porte à 349 le nombre total de ces nucléotides (Trowbridge and Gowans 1998).

Figure 3: Organisation génomique du VHC

(les limites représentées dans cette figure sont celles déterminées pour la souche H)



Cette région 5'NC a la particularité de contenir de multiples codons d'initiation de la traduction AUG, en amont du site de départ de la traduction. Néanmoins, les produits potentiels de ces petits cadres ouverts de lecture n'ont jamais pu être identifiés (Tsukiyama-kohara, et al. 1992).

En se basant sur différentes approches à la fois phylogénétiques, thermodynamiques et biochimiques, Brown et coll. ont proposé un modèle de la structure secondaire de l'extrémité 5' NC du VHC (Figure 4, Brown, et al. 1992). Elle s'avère constituée de quatre domaines majeurs (I à IV), le troisième étant analogue au domaine III déjà décrit chez les pestivirus. De nombreuses études ultérieures ont montré que ces structures secondaires constituaient un site d'entrée au ribosome (IRES) permettant une initiation de la traduction "coiffe-indépendante" (à partir d'ARN non coiffé), comme il a été montré chez les picornaviruses (Fukushi, et al. 1994, Reynolds, et al. 1995, Rijnbrand, et al. 1995, Tsukiyama-kohara, et al. 1992, Wang, et al. 1993).

Afin de déterminer les structures secondaires critiques au bon fonctionnement de l'IRES, ces mêmes équipes ont tenté de définir les extrémités 5' et 3' de cette séquence. Malgré les résultats contradictoires obtenus, cependant imputables à la diversité des modèles expérimentaux utilisés, il s'avère que l'IRES du VHC occupe la majeure partie de la région 5' NC et que la boucle I a une action suppressive sur la traduction. De plus, des mutations apportées au niveau de la région hautement conservée codant la protéine de capsid influencent fortement l'efficacité de la traduction médiée par l'IRES (Honda, et al. 1996, Rijnbrand, et al. 1995, Yoo, et al. 1992).

De petites régions conservées correspondant à des séquences complémentaires de l'ARN ribosomal 18S ont été mises en évidence dans le domaine III de l'extrémité 5' NC du VHC (Le, et al. 1995). En effet la séquence CCUUUCUUGGA, située au niveau des bases 192 à 203 du génome du VHC, apparaît complémentaire des bases 461 à 471 de l'ARN 18 S humain.

Enfin, l'initiation de la traduction serait, de plus, favorisée par la fixation de facteurs cellulaires. Yen et coll. ont en effet pu isoler deux protéines cellulaires (p87 et p120), respectivement impliquées dans la réplication virale et l'initiation de la traduction (Yen, et al. 1995). Une autre protéine de 25 kDa interagirait avec l'IRES (Fukushi, et al. 1997). Plus récemment, l'équipe de Sizova a montré que la protéine eIF3 (eucaryotic Initiation Factor 3), se fixe sur une partie du domaine III de l'IRES, et jouerait un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction en favorisant la fixation de l'ARN viral à la sous-unité 40 S du ribosome (Sizova, et al. 1998).

Il a été montré que l'IRES du VHC contenait des séquences polypyrimidine susceptibles de fixer la protéine PTB (polypyrimidine tract-binding protein), lui permettant ainsi d'assurer sa fonction (Ali and Siddiqui 1995). Des expériences de déplétion en PTB et de substitution des pyrimidines en purines suggèrent que les facteurs associés aux PTB, plus que la PTB elle-même, seraient cruciaux pour le bon fonctionnement de l'IRES (Ali and Siddiqui 1995, Kaminski, et al. 1995, Wang, et al. 1993). Parmi ces facteurs, p25 et p120 (décrits plus haut)

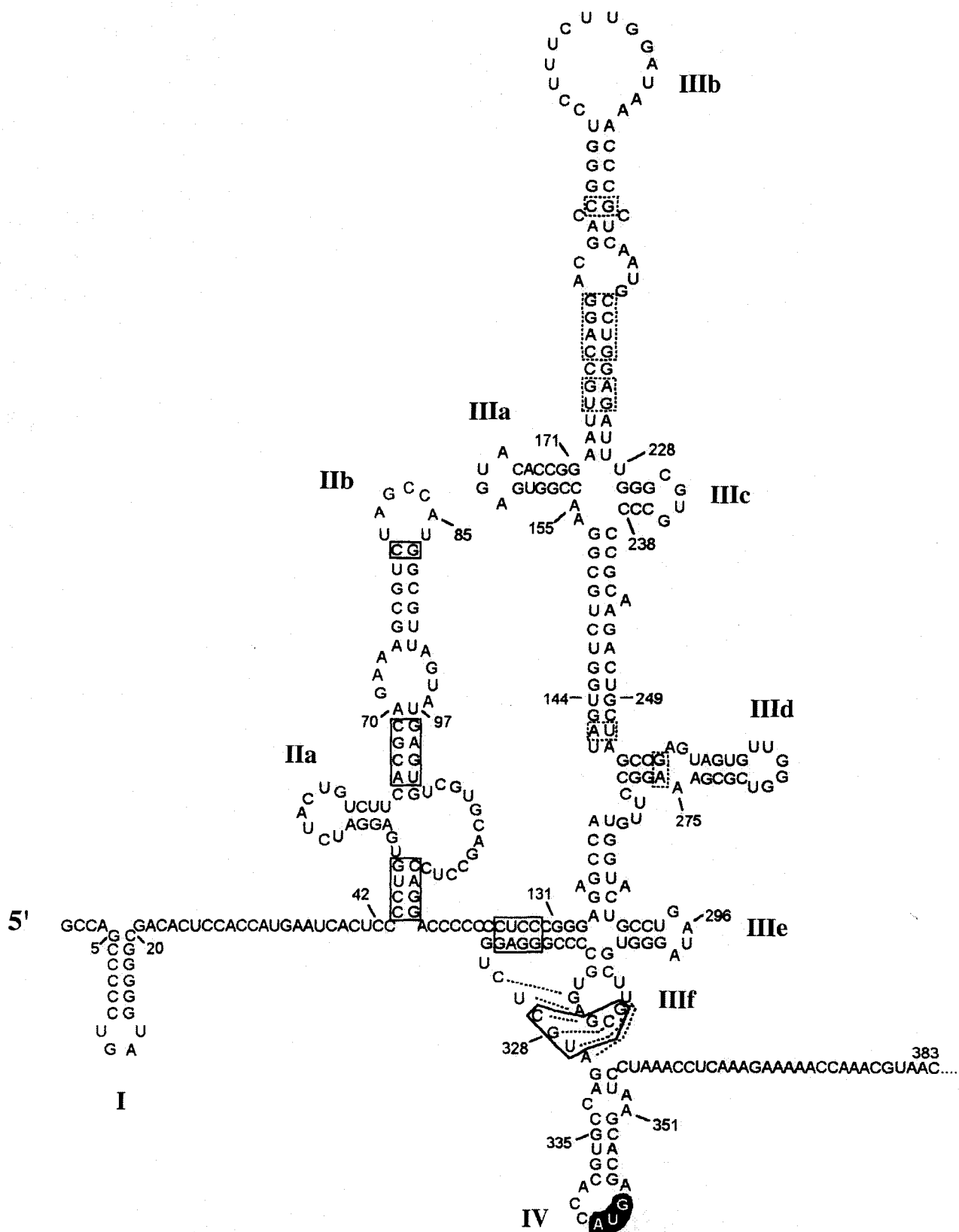


Figure 4 : Modèle de structure secondaire de l'extrémité 5' non-codante du génome du VHC

D'après Brown et al, (1992).

seraient indispensables à une traduction efficace, car leur mutation entraîne une diminution très significative de celle-ci.

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

L'extrémité 3' NC du VHC, contrairement à l'extrémité 5'NC, apparaît plus courte et beaucoup plus variable selon les génotypes (Han, et al. 1991). De nombreux travaux ont rapporté la présence d'une queue polyuridine s'étendant jusqu'au dernier nucléotide situé en 3' du génome du VHC (Chayama, et al. 1993, Chen, et al. 1991, Kato, et al. 1990, Okamoto, et al. 1992, Takamizawa, et al. 1991, Tanaka, et al. 1992), une seule équipe ayant plutôt déterminé une queue polyadénine (Han, et al. 1991).

Cependant, Tanaka et coll. ont mis en évidence une séquence de 98 nucléotides supplémentaires, faisant suite à la queue polyuridine (Kolykhalov, et al. 1996, Tanaka, et al. 1996). Cette séquence, très conservée chez tous les génotypes, possède une structure secondaire composée de trois domaines en boucles et en épingles à cheveux (Figures 5a et 5b). En plus de son rôle potentiel dans la synthèse du brin d'ARN négatif, cette structure 3' terminale serait à l'origine d'une régulation de la traduction IRES-dépendante, via la fixation de la PTB (Ito and Lai 1997). En effet, la fixation de la PTB sur l'extrémité 3' de la région 3' NC du VHC a été décrite à plusieurs reprises (Ito and Lai 1997, Tsuchihara, et al. 1997). Ainsi, l'interaction probable des extrémités 5' NC et 3' NC de l'ARN du VHC constitueraient une cible potentielle quant à l'utilisation d'une thérapie anti-virale.

2. Les protéines virales

2.1. Les protéines structurales

Les protéines structurales sont constituées par la protéine Core (C) ainsi que les glycoprotéines E1 et E2, obtenues après clivage par une (ou des) peptidase(s) signal cellulaire(s) localisée(s) dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) (Grakoui, et al. 1993a, Hijikata, et al. 1991a).

a. La protéine de capsid C

La protéine C est probablement le seul élément protéique constituant la capsid du VHC (Harada, et al. 1991). Il s'agit d'une protéine très basique dont la forme intracellulaire

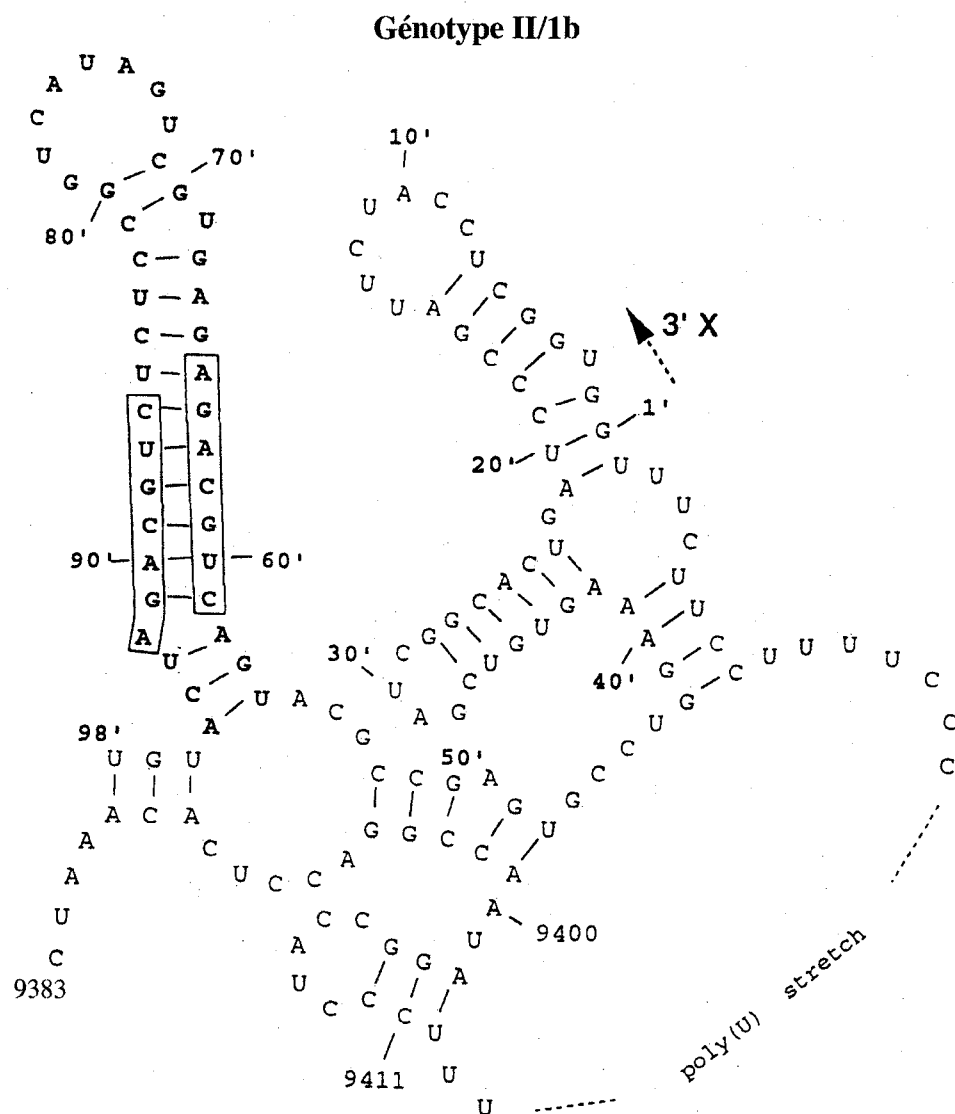


Figure 5a: Modèle de structure secondaire de l'extrémité 3' non-codante du génome du VHC (génotype II/1b)

D'après Tanaka et al, (1996).

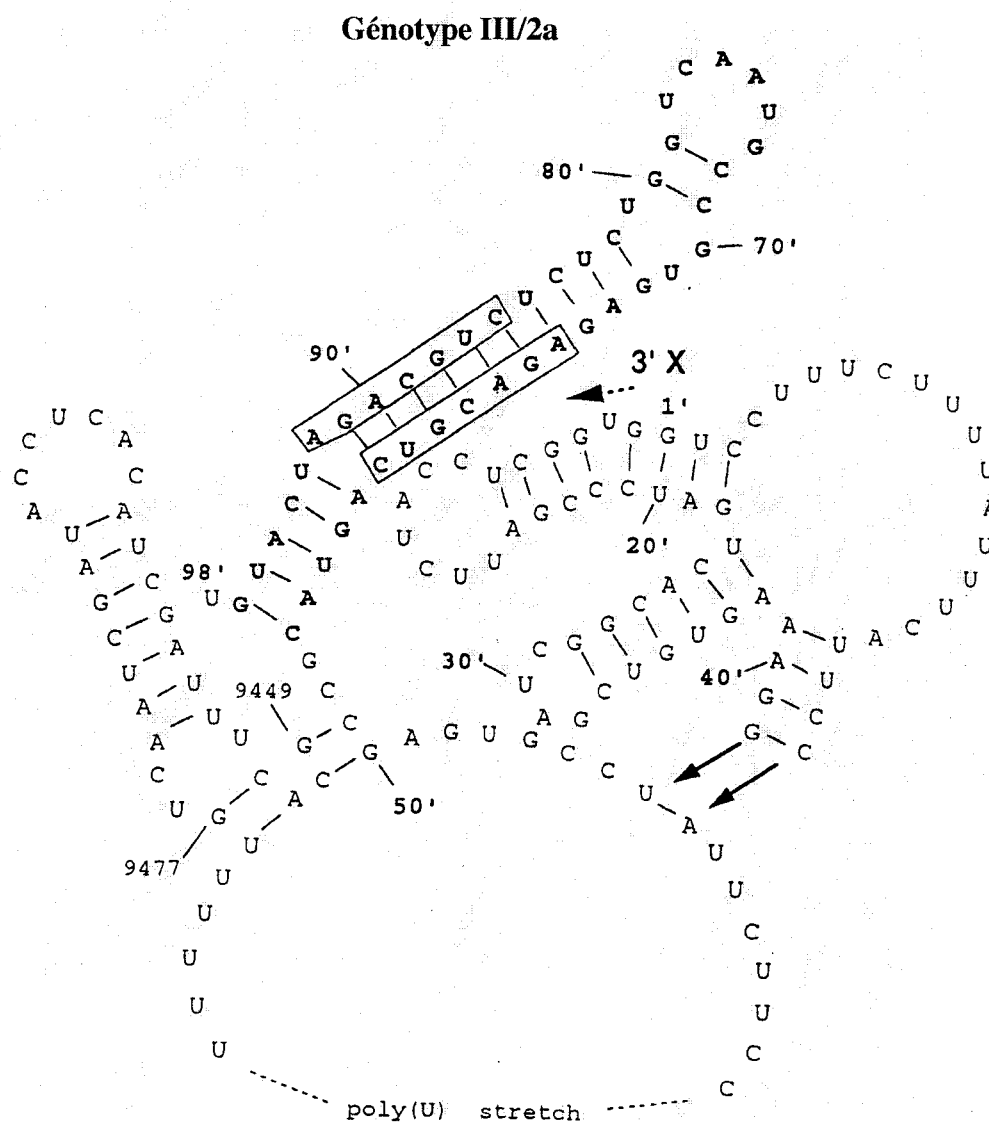


Figure 5b: Modèle de structure secondaire de l'extrémité 3' non-codante du génome du VHC (génotype III/2a)

D'après Tanaka et al, (1996).

prédominante de 21 kDa (p21) a été mise en évidence à plusieurs reprises grâce à des expériences de traduction *in vitro* (Hijikata, et al. 1991b, Lo, et al. 1994) et *in vivo* (Harada, et al. 1991).

La séquence carboxy-terminale de la protéine C contient deux domaines hydrophobes, dont un situé directement en amont de la séquence de la protéine d'enveloppe E1 (Takamizawa, et al. 1991). La quasi totalité de ce dernier domaine (aa 174 à 191) qui s'étend en fait sur 20 acides aminés (aa 170 à 191) semble constituer le peptide signal nécessaire à la ségrégation de E1 à travers la membrane du RE (Figure 6, Fournillier-Jacob, et al. 1996).

La protéine p21 peut être clivée par une protéase cellulaire encore inconnue, conduisant à l'élimination carboxy-terminale de la majeure partie de son domaine hydrophobe (174 à 191). Cette forme tronquée correspond à la protéine p19 (Santolini, et al. 1994). p19 semble être la forme majeure de la protéine C observée en expression dans des cellules de mammifères (Lo, et al. 1994). Cependant, une troisième forme de 16 kDa qui s'étend des acides aminés 1 à 151 a pu être détectée *in vitro* (Lo, et al. 1994).

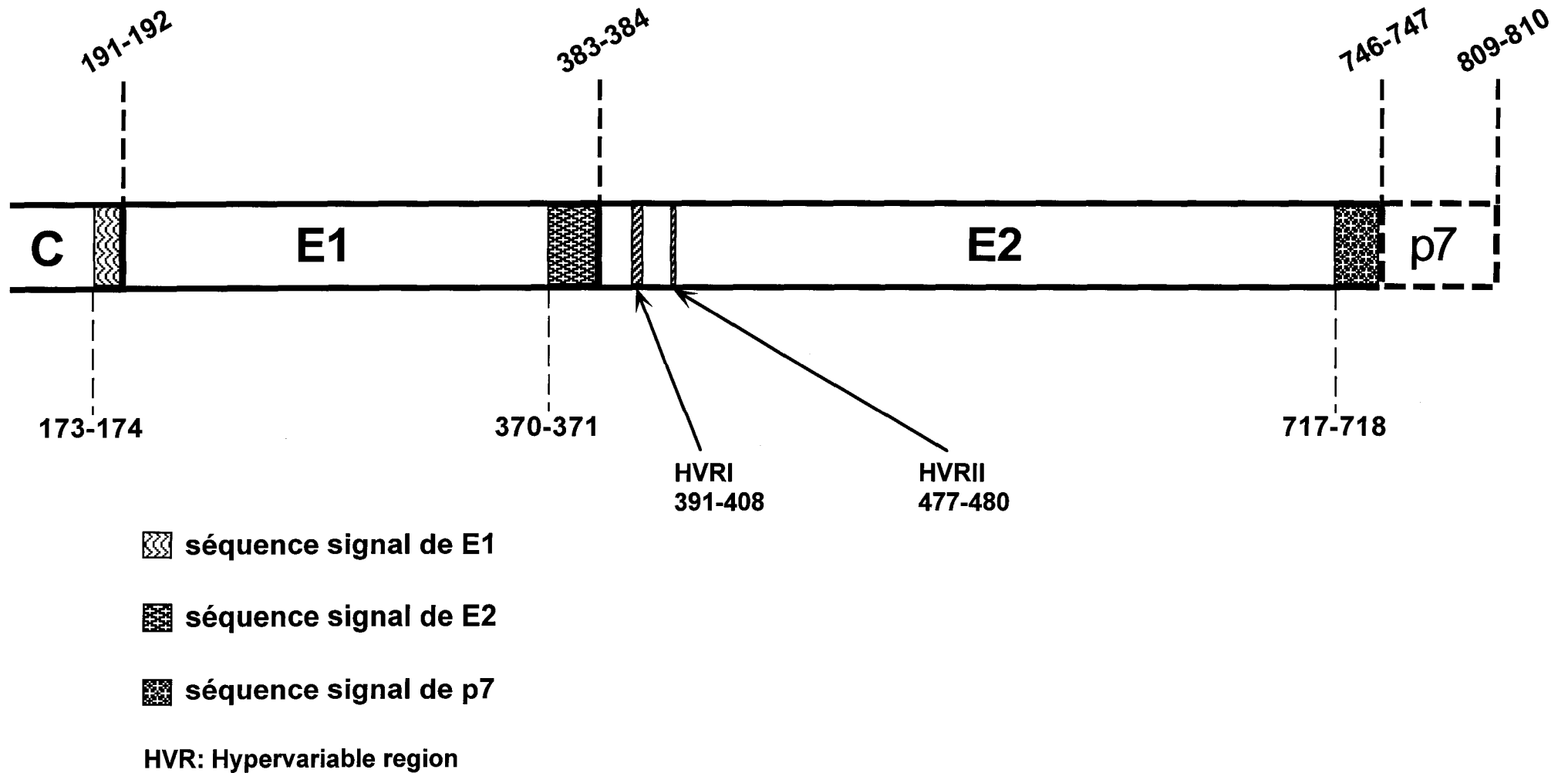
Des études de localisation subcellulaires de ces différentes protéines C montrent que p21 et p19 se situent dans le cytosol, ou en contact direct avec la membrane du RE, alors que p16 est retrouvée dans le noyau des cellules (Lo, et al. 1995, Santolini, et al. 1994, Selby, et al. 1993). L'équipe de Bréchet a d'autre part observé une accumulation de la forme majeure de la protéine C en surface de globules lipidiques cytoplasmiques (Barba, et al. 1997).

Plus récemment, Yasui et coll. ont produit des protéines C *in vivo* de 21 et 23 kDa (Yasui, et al. 1998). Il s'avère cependant que sur analyse de leur séquence en acides aminés (aa), ces deux formes correspondraient respectivement à p19 et p21.

Même si la masse moléculaire exacte de chacune des formes de la protéine C est sujette à controverse, il est admis que la protéine initialement produite de 191 aa subit un clivage cytoplasmique de ses 18 aa carboxy-terminaux (174-191). La forme ainsi obtenue (1-173) correspondrait à la protéine mûre composant la capsid de la particule virale. Cette hypothèse est renforcée par le fait que cette forme 1-173 est retrouvée dans le sérum de patients infectés par la VHC (Yasui, et al. 1998).

La fonction nucléaire potentielle de la protéine C (sous sa forme p16?) n'a pas encore été élucidée. Néanmoins, les travaux de Shih et coll. ont permis de mettre en évidence la suppression de l'expression et de la réplication du virus de l'hépatite B dans le noyau des cellules HuH-7 (Shih, et al. 1993). Il s'avère que cette suppression s'effectue via la phosphorylation de la protéine C grâce à la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique et à la protéine kinase C cellulaires (Shih, et al. 1995). L'action de la protéine C sur la transcription des gènes de la cellule hôte pourrait être l'un des facteurs à l'origine du phénomène de cancérisation qui peut apparaître à long terme chez les patients atteints d'hépatite chronique. En effet, cette protéine semble coopérer dans la transformation des cellules médiée par Ras, et inhiber l'apoptose (Ray, et al. 1996a, Ray, et al. 1996b, Shih, et al. 1995). Une étude récente a

Figure 6 : Localisation supposée des peptides signaux des protéines structurales du VHC.



de plus permis de montrer le développement d'un carcinome hépatocellulaire chez deux lignées de souris transgéniques pour le gène de la protéine C (Moriya, et al. 1998).

Une modulation de la réponse immune par la protéine C du VHC a été décrite par Matsumoto et coll. (Matsumoto, et al. 1997). Ces auteurs ont montré que la protéine C interagit avec la région C-terminale du récepteur lymphotoxin- β (LT β R), impliqué dans la formation de centres germinatifs responsables de l'activation de cellules B, au niveau du système lymphatique.

b. Les glycoprotéines E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 sont libérées de la polyprotéine virale, après clivage par une (ou des) signalase(s) cellulaire(s) (Figure 7). La glycoprotéine E1 d'un poids moléculaire apparent de 31 kDa (souche H), s'étend de l'aa 192 à l'aa 383 de la polyprotéine (Figure 3, Fournillier-Jacob, et al. 1996a, Hijikata, et al. 1991b). Pour sa part, la protéine E2 estimée à 70 kDa (souche H), couvre les aa 384 à 746 de la polyprotéine (Figure 3, Hijikata, et al. 1991b, Lin, et al. 1994a).

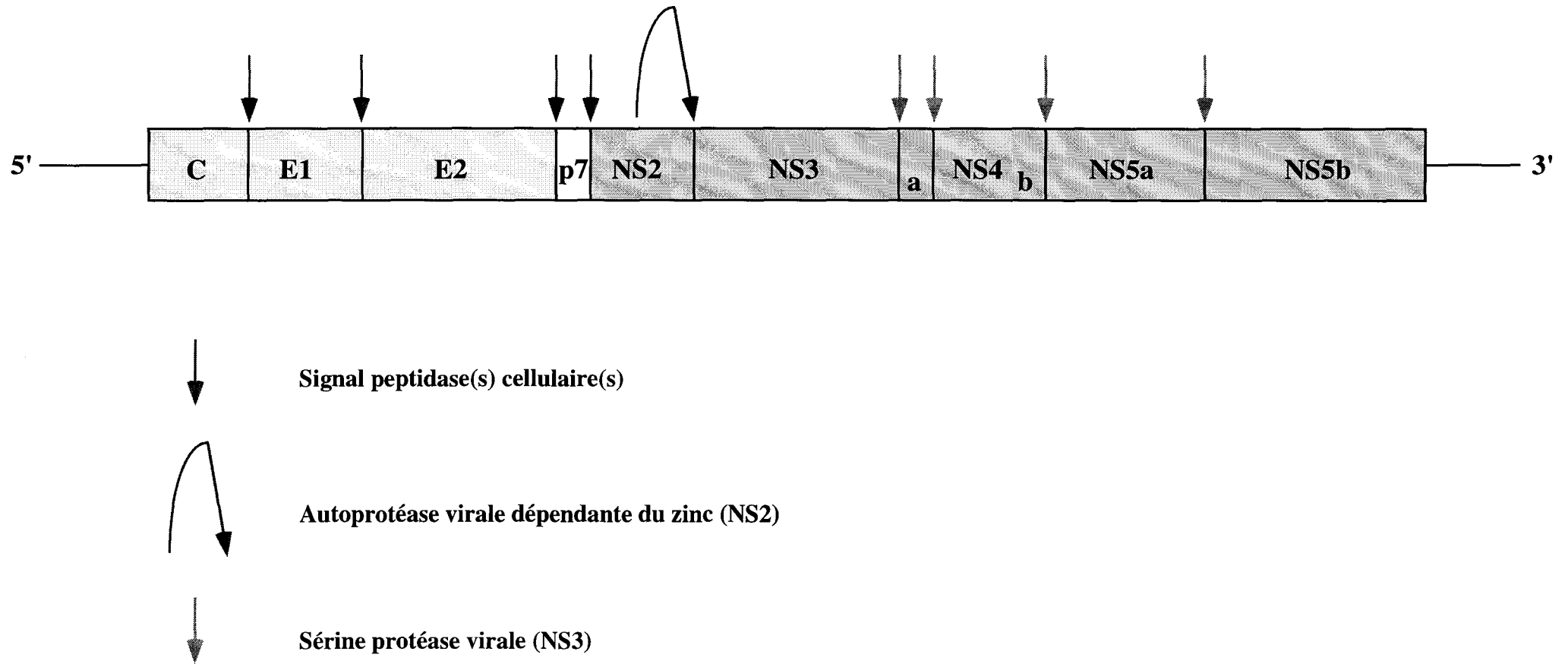
Comme nous le verrons beaucoup plus en détails dans le **Chapitre III**, ces deux glycoprotéines membranaires sont ségréguées, se replient et s'assemblent en complexes au sein du RE. C'est la forme hétérodimérique non-covalente qui correspond probablement au complexe de prébourgeonnement de l'enveloppe virale (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994).

2.2. Le polypeptide p7

Ce polypeptide de 7 kDa essentiellement constituée de résidus hydrophobes, fut identifié en 1994 (Lin, et al. 1994a). Sa fonction est encore inconnue à l'heure actuelle, et il est donc impossible de déterminer son appartenance à l'un ou l'autre des deux groupes de protéines virales (structurales ou non structurales).

Pour certaines souches du VHC, p7 est inefficacement clivée du côté amino-terminal et reste par conséquent associé à la protéine E2 sous la forme E2-p7 (Dubuisson, et al. 1994, Lin, et al. 1994a, Mizushima, et al. 1994a, Selby, et al. 1994). La signification moléculaire de cette association est encore indéterminée, bien que le même phénomène soit observé chez les pestivirus. En effet, chez ces derniers, une inefficacité similaire dans le clivage de E2/p7 est retrouvée, mais l'analyse de virions partiellement purifiés à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines p7 ou E2, montre que la forme E2-p7 n'est pas détectée à la surface des virions mûres (Elbers, et al. 1996).

Figure 7: Clivage de la polyprotéine codée par le génome du VHC.
(pour revue, Rice, 1996)



2.3. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales sont clivées grâce deux protéases virales distinctes (Figure 7):

- une protéase située sur NS2 et une partie de NS3 permettrait le clivage de la jonction NS2-NS3 (Grakoui, et al. 1993b, Hijikata, et al. 1993a).
- une sérine protéase située sur NS3 qui interviendrait au niveau de tous les clivages suivants: NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B (Bartenschlager, et al. 1993, Eckart, et al. 1993, Grakoui, et al. 1993c, Tomei, et al. 1993).

Ces protéines non structurales ont probablement pour fonctions principales la transcription et la réplication du génome viral, indispensables à la multiplication du VHC.

a. La protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine membranaire hydrophobe de 23 kDa, qui s'étend de l'aa 810 à l'aa 1026 de la polyprotéine (Figure 3, Mizushima, et al. 1994b, Santolini, et al. 1995). Le clivage entre NS2 et NS3 serait dû à l'action d'une protéase zinc-dépendante partagée par NS2 elle-même ainsi que et le tiers amino-terminal de NS3 (Grakoui, et al. 1993b, Hijikata, et al. 1993a). Le domaine catalytique de cette autoprotéase serait essentiellement situé sur NS2, au niveau des aa histidine 952 et cystéine 993.

b. La protéine NS3

La protéine NS3, dont les extrémités amino- et carboxy-terminales sont respectivement délimitées par les aa 1027 et 1657, possède une masse moléculaire apparente de 70kDa (Figure 3). Cette protéine assure plusieurs fonctions:

- Son extrémité amino-terminale possède une activité sérine-protéasique (Bartenschlager, et al. 1993, Eckart, et al. 1993, Grakoui, et al. 1993c, Tomei, et al. 1993). L'équipe de Miyamura a mis en évidence le domaine fonctionnel minimum de cette protéase, qui s'étendrait sur 146 aa, entre l'aa 1059 et l'aa 1204 (Yamada, et al. 1998).

Le rôle de la sérine protéase NS3 est d'assurer le clivage entre les différentes protéines non structurales situées en aval de celle-ci: NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, et NS5A-NS5B. Le site de clivage constitué par la séquence très conservée Asp/Glu(X)₄Cys(Thr) → Ser(Ala) doit être préalablement reconnu pour que la coupure enzymatique ait lieu (Eckart, et al. 1993, Grakoui, et al. 1993c, Pizzi, et al. 1994).

- L'extrémité carboxy-terminale de la protéine NS3 se caractérise par une activité hélicase dépendante de l'ARN ainsi qu'une activité NTP-ase (Hong, et al. 1996, Kim, et al. 1995a, Tai, et al. 1996). Le motif Asp-Glu-Cys-His (DECH en code lettre) présent au niveau des aa 1316-1319 confère l'appartenance de cette protéine à la famille des hélicases ARN-dépendantes à « DEAD box » (Kim, et al. 1995a). Ainsi, elle participerait au déroulement de l'ARN génomique au cours de la réplication et à la séparation des duplexes ARN-ARN formés, ces deux activités nécessitant la présence d'ATP et d'ions divalents Mg^{2+} et Mn^{2+} (Gwack, et al. 1996).

- Récemment Ishido et coll. ont montré que la protéine NS3 interagissait par l'intermédiaire de sa partie amino-terminale avec la protéine NS5B (Ishido, et al. 1998). Il s'avère que le complexe alors formé se fixerait sur NS5A dans le but de participer à la réplication du génome viral.

Des analyses de cristallographie aux rayons X de la sérine protéase NS3 révèlent une structure similaire à celle des membres de la superfamille de la trypsine (Kim, et al. 1996a, Love, et al. 1996). De plus, des études faites chez la bactérie *Escherichia coli* montrent clairement la présence d'un site de liaison au zinc, dont le rôle serait plus structural que catalytique (De Francesco, et al. 1996).

c. La protéine NS4A

La séquence en aa de cette petite protéine de 8 kDa s'étend de l'aa 1658 à l'aa 1711 de la polyprotéine (Figure 3). La région centrale de NS4A serait impliquée dans les clivages effectués par NS3, plus particulièrement au niveau du site NS4B/NS5A (Landro, et al. 1997, Lin, et al. 1997). Les acides aminés 22 à 31 sur la protéine NS4A ont été décrits par Shimizu comme étant la séquence minimum nécessaire à cette activité de cofacteur (Shimizu, et al. 1996). De plus, la protéine NS4A permettrait l'association de NS3 à la membrane du RE, afin que cette dernière puisse accomplir sa fonction protéasique.

Comme nous le verrons dans le paragraphe e. (page 15), NS4A semble participer à l'augmentation de la production de la protéine NS5A sous sa forme hyperphosphorylée de 58 kDa (Asabe, et al. 1997, Kaneko, et al. 1994, Tanji, et al. 1995).

d. La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa dont les extrémités amino- et carboxy-terminales sont situées respectivement au niveau des aa 1712 et 1972 de la polyprotéine (Figure 3). Sa fonction n'est toujours pas élucidée à ce jour, même si la protéine équivalente présente

chez les autres genres de la famille des *Flaviviridae* semble impliquée dans le complexe de réplication viral.

e. La protéine NS5A

NS5A est une protéine de 58kDa dont la séquence en acides aminés s'étend de l'aa 1973 à l'aa 2420 de la polyprotéine (Figure 3).

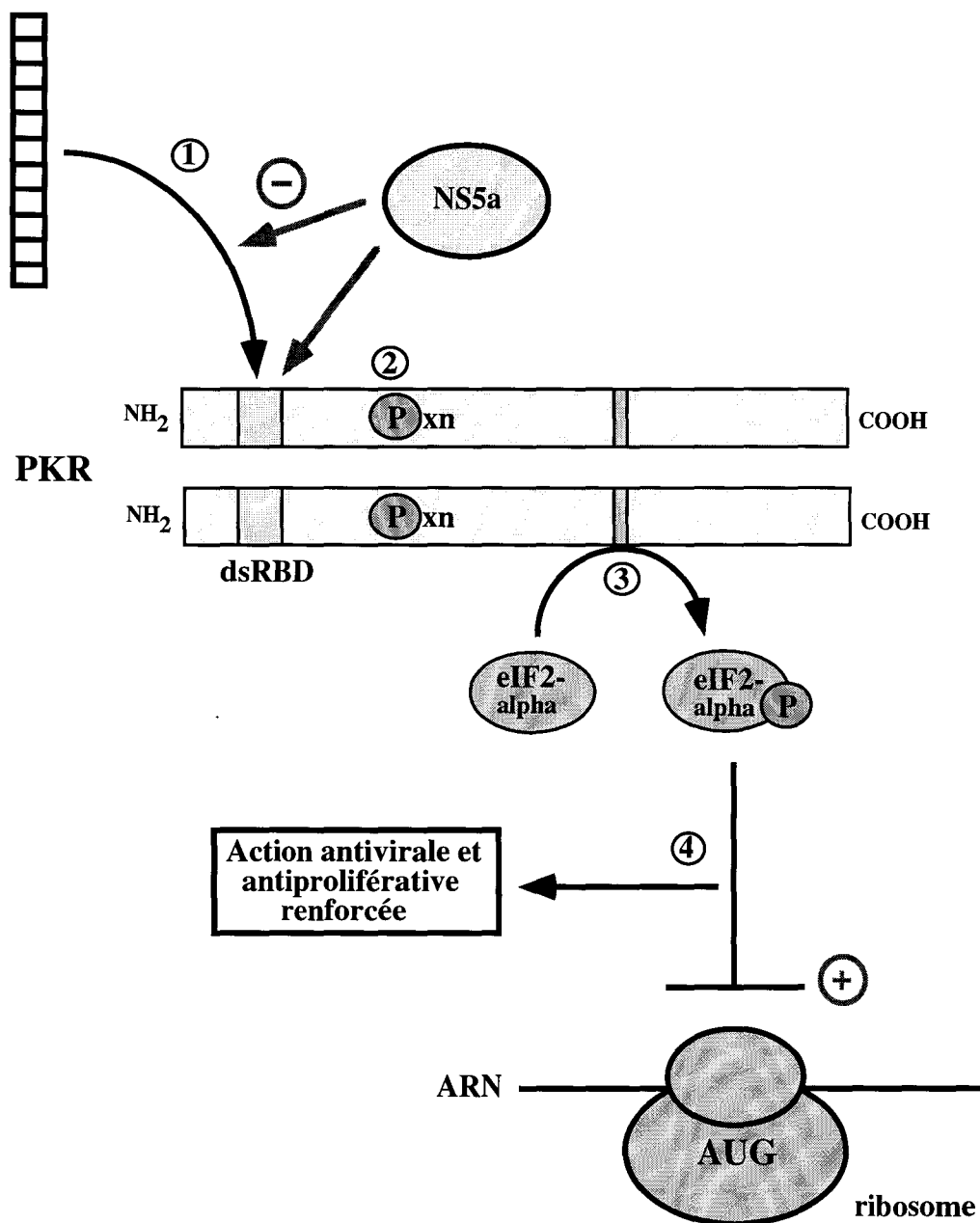
La protéine NS5A existe sous deux formes, différant entre elles par leur degré de phosphorylation: la forme de 56 kDa est phosphorylée, alors que celle de 58 kDa est hyperphosphorylée (Asabe, et al. 1997, Kaneko, et al. 1994, Tanji, et al. 1995). Cette phosphorylation s'effectue principalement sur des résidus sérine, grâce à une protéine kinase non encore identifiée, notamment à cause de l'absence de motifs spécifiques typiquement reconnus par ce type de protéine.

Par analogie à deux autres membres de la famille des *Flaviviridae* (le virus de la diarrhée virale bovine et le virus de la fièvre jaune), il semble que le rôle joué par la phosphorylation soit en rapport avec le cycle réplicatif (Reed, et al. 1998b). D'autre part, une étude portant sur la protéine NS5 du virus de la dengue, un membre du genre flavivirus, a montré que la phosphorylation pouvait être corrélée avec une localisation nucléaire de la protéine (Kapoor, et al. 1995). Cette hypothèse fut renforcée par la mise en évidence d'un signal de localisation nucléaire caractéristique sur NS5A (Ide, et al. 1996). Cependant, la protéine NS5A apparaît principalement périplasmique, et l'effet induit par sa phosphorylation n'a pas encore été élucidé (Ide, et al. 1996, Tanji, et al. 1995).

Comme nous le verrons dans les paragraphes **F.2.** et **I.** (pages 18 et 26), NS5A contient une séquence responsable de la résistance au traitement par l'interféron α (Enomoto, et al. 1995, Enomoto, et al. 1996a). La séquence précise de cette ISDR (interferon-sensitivity-determining region) se situerait au niveau des acides aminés 2209 à 2248 pour le génotype 1b. Cette étude a ensuite été étendue au génotypes 2a et 2b, ce qui a permis aux auteurs d'établir un "prototype" correspondant à la séquence de HCV-J (type sauvage), qui définit la résistance à l'interféron. Par conséquent, le modèle postule que si la séquence de l'ISDR du génome viral diffère de plus de trois aa par rapport au prototype, ce virus est considéré comme sensible à l'interféron. Cette corrélation reste cependant incertaine car plusieurs équipes n'ont pas pu obtenir de résultats conformes aux travaux d'Enomoto (Khorsi, et al. 1997, Squadrito, et al. 1997, Zeuzem, et al. 1997). Néanmoins, des études récentes ont montré que le mécanisme de résistance à l'interféron se faisait en partie via la répression de la PKR (protein kinase RNA-dépendant) par la NS5A (Gale, et al. 1997). En effet, les auteurs ont observé une interaction directe entre le site catalytique de la PKR et l'ISDR de la protéine NS5A, qui constituerait l'un des mécanismes mis en place par le virus pour éviter l'effet antiviral de l'IFN (Figure 8, Meurs 1997). Par des travaux plus approfondis, ces mêmes auteurs ont mis en évidence la participation de 26 aa

Figure 8: Mode d'action de la PKR sur la prolifération cellulaire et la multiplication virale, et mécanisme supposé de la résistance à l'interféron chez certains patients infectés par le VHC (pour revue, Meurs, 1997).

ARN double brin



- ① Fixation de l'ARN bicaténaire sur les motifs "double-strand RNA binding domains" (dsRBD) de la PKR (protéine kinase dépendante d'ARN bicaténaire)
- ② Autophosphorylation de la PKR
- ③ Phosphorylation du facteur de transcription eIF2-alpha par la PKR
- ④ Inhibition de la traduction des ARN cellulaires et viraux

La fixation de la protéine NS5a du VHC de "prototype" VHC-1b (résistant à l'interféron) inhibe la phosphorylation de la PKR (**(-)**) et lève l'inhibition de la traduction (**(+)**)

supplémentaires dans l'interaction de la NS5A avec PKR (Gale, et al. 1998a). Ces aa sont situés du côté C-terminal de l'ISDR, et interagiraient avec une région de la PKR récemment décrite comme étant son domaine de dimérisation. En accord avec ce résultat, ils ont observé que la NS5A issue du génotype 1b empêche la dimérisation de la PKR *in vivo*, et conduit à l'inhibition de la phosphorylation du facteur de transcription eIF-2 α , la traduction de l'ARN viral pouvant donc se poursuivre.

f. La protéine NS5B

NS5B est une protéine hydrophile de 68 kDa, dont les extrémités amino- et carboxy-terminales sont situées respectivement au niveau des aa 2421 et 3011 (Figure 3).

Cette protéine contient un motif GDD (Gly-Asp-Asp), caractéristique des polymérases ARN-dépendantes, et notamment présent chez les virus à ARN brin positif (Behrens, et al. 1996). Behrens et coll. ont d'ailleurs pu observer l'activité polymérasique de la NS5B, à partir de protéine purifiée issue de cellules d'insecte infectées par un recombinant baculovirus codant la protéine NS5. Cette activité a été mise en évidence aussi bien sur un substrat viral (618 nucléotides de la souche HCV-BK) que sur un substrat cellulaire (ARN messager).

La localisation périmembranaire de NS5B qui se trouve en association avec les membranes cellulaires suggère que la réplication virale a lieu en association avec la membrane du RE, autour du noyau (Hwang, et al. 1997).

E. La molécule CD81, un récepteur potentiel pour le VHC ?

En raison de l'absence de système de culture cellulaire permettant la multiplication efficace du VHC, le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte reste inconnu. Cependant, une étude récente menée par l'équipe d'Abrignani a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine d'enveloppe E2 et une molécule présente à la surface de certaines cellules humaines: CD81 (Pileri, et al. 1998). Ces travaux suggèrent que cette molécule pourrait être un récepteur potentiel pour le VHC.

CD81 est une protéine de 27 kDa possédant quatre domaines transmembranaires ainsi que deux boucles extracellulaires (Levy, et al. 1998). Cette protéine est retrouvée chez de nombreux types cellulaires, dont les hépatocytes ainsi que les lymphocytes B. La boucle majeure de CD81 demeure très conservée chez l'homme et le chimpanzé, considérés comme les deux seules espèces pouvant être infectées par le VHC, et dont les cellules sont par conséquent susceptibles d'interagir avec E2 (Pileri, et al. 1998).

La confirmation d'une liaison effective et spécifique de l'espèce entre E2 et CD81 a été montrée, d'une part, par des expériences d'inhibition d'interaction grâce à des anticorps anti-

CD81, et d'autre part, en testant cette reconnaissance sur des protéines CD81 chimères murines et humaines.

La participation potentielle de CD81 dans la première étape de l'infection par le VHC laisse présager de nombreux espoirs quant à la compréhension de la pathogénèse de ce virus ainsi que dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

F. La variabilité génomique du VHC

1. Le géotypage

Le génome du VHC est constitué d'un brin monocaténaire de polarité positive, et comme tous les virus de ce type, son ARN polymérase ARN-dépendante ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléasique. Par conséquent, le virus est incapable de réparer son 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). Cette variabilité est à l'origine de différents géotypes et sous-types actuellement répertoriés (Figure 9).

Ainsi, la classification en différents géotypes a été établie selon le degré d'homologie de séquence. Il est donc établi que des génomes viraux ayant plus de 80% d'homologie appartiennent au même géotype. Néanmoins, un grand nombre de classifications ont été proposées par diverses équipes mais aucun consensus n'existe à l'heure actuelle.

La séquence prototype HCV-1 du VHC à laquelle toute nouvelle séquence est comparée a été isolée d'un chimpanzé infecté par un sérum concentré en facteur VIII issu d'un sujet américain (Choo, et al. 1991, Houghton, et al. 1991).

La classification de Simmonds et coll., basée sur les séquences nucléotidiques de l'extrémité 5' et des gènes codant pour les protéines C, NS3 et NS5 est cependant la plus utilisée (Chan, et al. 1992, Simmonds, et al. 1993). Selon l'ordre de leur découverte, les géotypes sont désignés par des chiffres, et les sous-types par des lettres. Cette classification permet aujourd'hui de distinguer six géotypes et plus de onze sous-types.

La distribution géographique des différents géotypes a fait l'objet de nombreuses investigations (Bréchet and Kremsdorf 1993, Cha, et al. 1992, Chayama, et al. 1993, Kleter, et al. 1994, Li, et al. 1991, Stuyver, et al. 1993, Tanaka, et al. 1992). Le géotype 1b est le plus fréquent à travers le monde, avec une prévalence élevée au Japon et en Europe de l'Est. Le prototype 1a est relativement rare dans ces pays, mais semble plus commun aux Etats-Unis. Le géotype 2 existe moins en Europe qu'au Japon et en Chine. Les géotypes 3 à 6 ont été identifiés plus récemment et leur distribution est assez hétérogène (Afrique, Moyen-Orient, Asie, ...).

Isolat	Simmonds	Bukh/ Purcell	Chan	Cha/ Urdea	Enomoto/ Date	Okamoto
• HCV-1, H	1a	I/1a	1a	I	K-PT	I
• HCV-J, HCV-BK	1b	II/1b	1b	II	K-1	II
• EG-28	1c	1c	nc	nc	nc	nc
• HC-J6	2a	III/2a	2a	III	K-2a	III
• HC-J8	2b	IV/2b	2b	III	K-2b	IV
• T0994	2c	2c	nc	III	nc	nc
• E-b1, Ta	3a	V/3a	3	IV	nc	V
• Tb	3b	nc	nc	IV	nc	VI
• EG-16, GB116, Z4	4a	4a	4	nc	nc	nc
• GB549, Z1	nc	4b	nc	nc	nc	nc
• GB809, Z6	nc	4c	nc	nc	nc	nc
• DK13	nc	4d	nc	nc	nc	nc
• SA1, PC	5a	5a	nc	V	nc	nc
• HK1	nc	6a	6a	nc	nc	nc

Figure 9: Nomenclatures des différents types et sous-types génomiques du VHC. Simmonds et al., 1993, Bukh et al., 1994, Chan et al., 1992, Cha et al., 1992, Enomoto et al., 1990, Okamoto et al., 1992. nc: non classifié.

Les variations génotypiques apparaissent de façon ciblée sur le génome. En effet, les mutations semblent plus fréquentes dans la région 3' non-codante (Han and Houghton 1992), ainsi que dans la région codant pour les protéines E1 et E2 (Weiner, et al. 1991a). La glycoprotéine E2 possède en effet deux régions hypervariables nommées HVRI (391-408 sur la polyprotéine) et HVRII (aa 474-480) (Figure 6, Higashi, et al. 1993, Hijikata, et al. 1991a, Weiner, et al. 1992).

2. L' influence du génotype

2.1. Sur la maladie et son traitement

Il semble y avoir un lien entre les différents génotypes (et sous-types) et les conséquences cliniques qui en découlent. Ainsi, on observe une incidence du génotype dans la réponse au traitement par l'interféron et dans le risque de développer une cirrhose ou un carcinome hépatique (Shiratori, et al. 1997, Takagi, et al. 1997). Le génotype 1 apparaît plus résistant au traitement, mais la différence de réponse entre les sous-types 1a et 1b, ainsi que l'influence de la région ISDR de la protéine NS5A restent sujet à discussion (Pawlotsky, et al. 1996a, Davis et Lau 1997, Khorsi, et al. 1997, Enomoto, et al. 1995, Pawlotsky, et al. 1998). Par conséquent, la sensibilité ou la résistance d'un génotype donné au traitement par l'interféron trouverait son origine au niveaux de plusieurs séquences réparties sur l'ARN viral.

En outre, on sait aujourd'hui que des mutations apparaissent sur le génome viral au cours du temps chez les sujets infectés. Plusieurs génotypes peuvent être mis en évidence chez le même malade (Farci, et al. 1994, Higashi, et al. 1993, Li, et al. 1991), et une hétérogénéité de la région HVRI peut être observée à différents stades de sa maladie (Kato, et al. 1994).

Un certain nombre d'études suggèrent que l'établissement de la chronicité et la sévérité de la maladie pourraient être liés au génotype (Amoroso, et al. 1998, Silini, et al. 1995a). Cependant, il est important de prendre aussi en compte les nombreux facteurs épidémiologiques et individuels de chaque patient. Notamment, une prédisposition à développer un carcinome hépatocellulaire a été observée chez des patients présentant une cirrhose de type C et consommant régulièrement de l'alcool (Yoshihara, et al. 1998). Cependant, le mécanisme qui induit ce type de cancer du foie reste encore obscur, même si une augmentation des taux d'ARN viral et d'ALTs a pu être observé (Schiff 1997).

2.2. Sur le mode de transmission

Dans certains cas d'infection par le VHC, il semblerait exister une corrélation entre le mode de transmission et le génotype détecté. Ainsi, la transmission par transfusion sanguine apparaît associée au sous-type 1b, alors que la transmission intraveineuse chez les toxicomanes serait plutôt associée aux sous-types 3a et 1a (Basaras, et al. 1997, Kleter, et al. 1998, Pawlowsky, et al. 1995).

G. Diagnostic de l'hépatite C

Le diagnostic d'une hépatite C est essentiellement biologique. Il repose sur un diagnostic viral direct (détection du génome viral), ainsi que sur un diagnostic indirect (tests sérologiques).

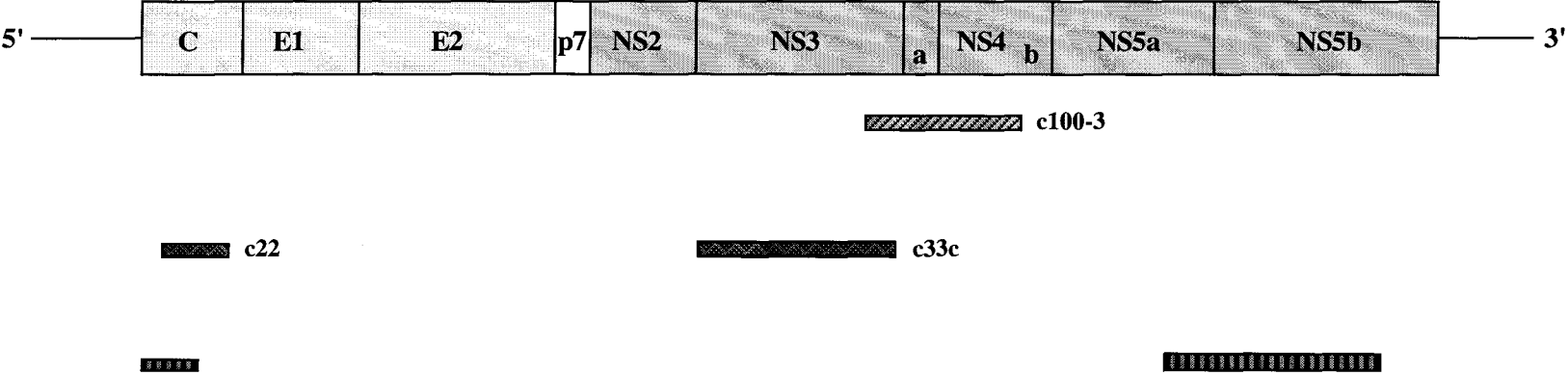
1. Diagnostic sérologique

Le développement des tests sérologiques a permis de diminuer considérablement la contamination par transfusion sanguine (de 6% dans les années quatre-vingt à 1/200 000 cas actuellement, Conférence de consensus, Paris, 1997). L'élaboration de ces tests permettant la mise en évidence d'anticorps anti-VHC s'est faite en plusieurs étapes (Figure 10):

- Les tests de première génération de type immuno-enzymatiques, ou ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) furent élaborés en 1989 et mis sur le marché en 1990 (Kuo, et al. 1989). Le principe de ce test consistait en l'utilisation de la protéine recombinante c100-3 en tant qu'antigène. Cette protéine correspond en effet à la séquence peptidique de jonction entre les protéines NS3 et NS4 du virus de l'hépatite C. Il s'avéra néanmoins que ce test ne permettait de détecter que 80% des patients infectés et conduisait à des résultats faussement positifs. Par conséquent, ces résultats non concluants durent être complétés par des tests de validation.

- Ainsi, des tests de deuxième génération basés sur la technique d'immunoblotting RIBA (recombinant immunoblot assay) furent élaborés. En plus de la protéine c100-3, on ajouta des antigènes recombinants tels que la protéine c22 (correspondant à une partie de la protéine de capside) et la protéine c33c qui couvre la majeure partie de NS3 (Katayama, et al. 1992). Il est à noter que le facteur affectant le plus le taux de détection des anticorps anti-VHC chez les patients est la variabilité antigénique des protéines. C'est pour cette raison que des domaines antigéniques peu variables correspondant aux protéines C, NS3 et NS4 ont été choisis.

Figure 10: Antigènes dérivés du génome du VHC utilisés dans les tests de dépistage de type ELISA.



Les antigènes principaux des tests de première génération  (Kuo et al., 1989)
 de deuxième génération  (Katayama et al., 1992)
 et de troisième génération  (Nakagiri et al., 1995) sont représentés.

- 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 séquences peptidiques de E2 ou NS5 (Nakagiri and Ichihara 1995). Cependant, plusieurs problèmes restent à résoudre dans le sérodiagnostic des infections par le VHC. Notamment, certains patients immunodéprimés présentent des profils « indéterminés », correspondant à une réactivité très faible, voire dirigée contre un seul des antigènes testés. D'autre part, l'apparition tardive des premiers anticorps (séroconversion) suite à l'infection virale empêche toute détection précoce.

2. Diagnostic par détection de l'ARN viral

Le diagnostic moléculaire permet au médecin de se faire une idée précise de la charge virale du patient et donc d'améliorer le suivi de son traitement antiviral. Aucun antigène viral ne peut être détecté directement sur une biopsie de foie ou dans un liquide biologique, étant donné sa trop faible concentration. C'est pourquoi les techniques d'amplification (détection du génome par amplification enzymatique ou par la technique dite de l'ADN branché) se sont avérées indispensables.

L'ARN viral peut être détecté par amplification enzymatique ou « polymérase chain reaction » (PCR) dans le sang, le plasma, les cellules mononuclées ou les biopsies hépatiques de patients infectés (Figure 11). La technique consiste d'abord en la rétrotranscription de l'ARN viral en un brin d'ADN complémentaire (cADN). Ensuite, à l'aide d'amorces choisies (situées dans la région 5' non codante très conservée chez les différentes souches du VHC), ce cADN est amplifié par PCR (Bukh, et al. 1992b, Bukh, et al. 1992a). Malgré la sensibilité accrue de cette méthode, ainsi que la précocité de la détection (1 semaine après la contamination, Farci, et al. 1992), il persiste des problèmes de standardisation et de contaminations.

- La détection par la technique de l'ADN branché apporte un aspect quantitatif qui constitue un avantage par rapport à la PCR (Figure 12, Urdea, et al. 1991). Commercialisée par la société Chiron (Quantiplex^R HCV RNA 1.0 et 1.2, Chiron Diagnostics), cette méthode consiste en une capture en sandwich de la molécule cible d'ARN par des sondes spécifiques bivalentes. Ces sondes bivalentes sont ensuite hybridées par une seconde sonde dite « ADN branché » puisqu'elle sert elle-même de support à de nombreuses sondes marquées à la phosphatase alcaline. Un substrat spécifique de cette enzyme est alors introduit dans le mélange, ce qui entraîne l'émission d'un signal lumineux proportionnel à la quantité de génome cible. Cette technique est moins sensible que la PCR, mais elle est plus rapide et élimine la quasi totalité des risques de contamination car la molécule cible n'est pas amplifiée.

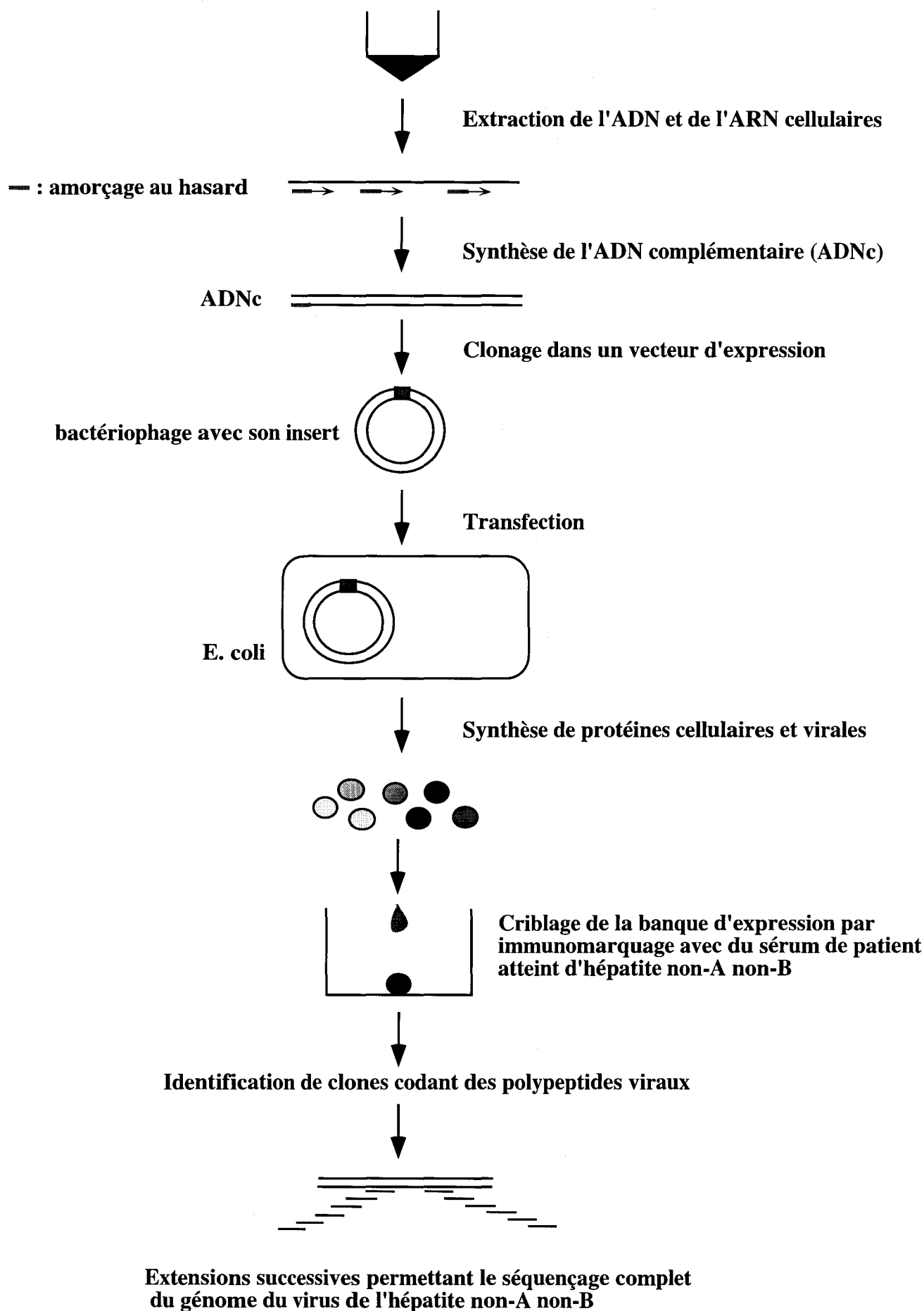


Figure 11: Principe de l'isolement du virus de l'hépatite C, d'après Choo et al., 1989.

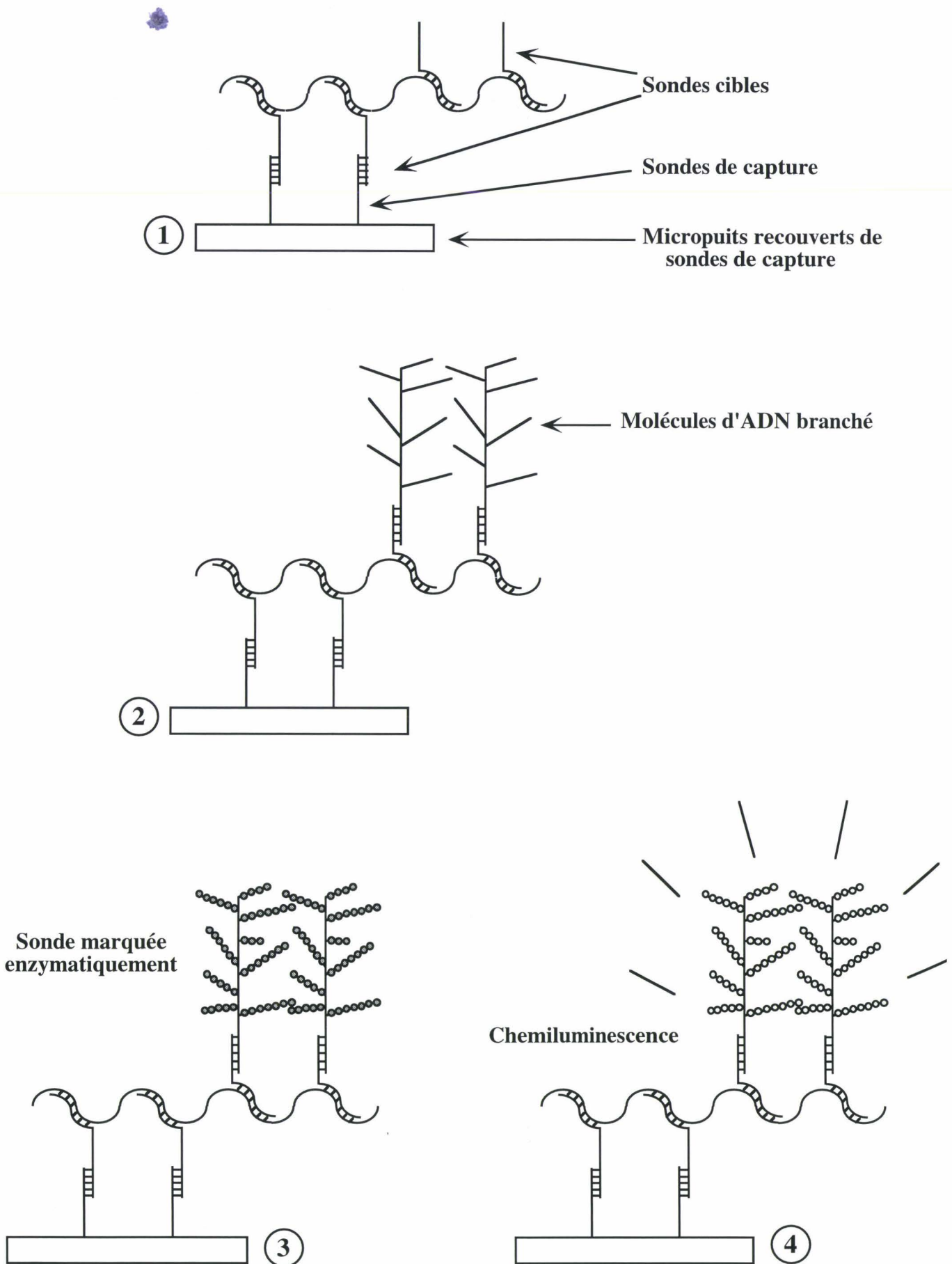


Figure 12: Principe de détection de l'ARN viral par la technique de l'ADN branché, d'après Chiron Diagnostics (Quantiplex[®] HCV RNA 1.0 et 2.0).

H. La réponse immunitaire induite au cours des infections par le VHC

1. La réponse immunitaire à médiation humorale

Il est difficile d'étudier les propriétés immunologiques du VHC, notamment parce qu'il n'existe pas actuellement de système cellulaire permettant une multiplication virale efficace et que le seul modèle animal est le chimpanzé. Cependant, la localisation d'un certain nombre d'épitopes B situés sur certaines protéines virales (C, E2, NS3, NS4A/B, NS5A/B) a pu être mise en évidence principalement grâce à l'aide de peptides de synthèse (Akatsuka, et al. 1993, Choo, et al. 1991, Enomoto, et al. 1990a, Kato, et al. 1990, Kremsdorf, et al. 1991, Mink, et al. 1994, Ogata, et al. 1991, Okamoto, et al. 1992, Simmonds, et al. 1993, Tanaka, et al. 1992). Beaucoup d'autres épitopes sont de nature conformationnelle, et il s'est donc avéré difficile de les cartographier. Il a cependant été possible d'étudier la réaction immunitaire humorale développée vis à vis de la protéine C et des protéines non structurales (NS3, NS4 et NS5) au cours de l'infection par le VHC. Pour ce faire, les auteurs ont utilisés les tests sérologiques de 1ère, 2ème et 3ème génération pour le suivi d'infections post-transfusionnelles. Ce sont les anticorps anti-NS3, anti-C et anti-NS5 qui apparaissent le plus précocement, entre 3 et 12 semaines après la transfusion (Zaaijer, et al. 1994). On observe ensuite l'apparition des anticorps anti-NS4 (entre la 11ème et la 22ème semaine) qui sont sensés refléter la multiplication virale (Weiner, et al. 1990).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC sont considérées par analogie avec celles des flavivirus et des pestivirus comme les antigènes capables d'induire une réponse humorale neutralisante. L'existence d'anticorps neutralisants a d'ailleurs été suggéré par plusieurs études:

- Le groupe de Shimizu a démontré l'existence, dans le sérum de chimpanzés porteurs chroniques du VHC, la présence d'anticorps capables de bloquer *in vitro* l'attachement d'une souche homologue de virus sur les cellules susceptibles HPB-Ma. Cette observation a permis de mettre au point un test de neutralisation du VHC *in vitro* et de déterminer que ces anticorps neutralisants seraient dirigés contre la région hypervariable de l'enveloppe E2 (Shimizu, et al. 1994).

- Toujours *in vitro*, Farci et coll. ont réalisé des expériences de neutralisation du virus issu du plasma d'un patient atteint d'une hépatite C aigüe à l'aide des anticorps apparus ultérieurement chez ce même patient au cours de son hépatite chronique (Farci, et al. 1994). Cette étude a montré que l'infection par le VHC est bien à l'origine de la production d'anticorps neutralisants mais que ceux-ci sont spécifiques d'une « quasi-espèce ». Ces mêmes auteurs ont tenté d'identifier les domaines de neutralisation du VHC (Farci, et al. 1996). Il s'avère que la région hypervariable 1 (HVRI) de la protéine d'enveloppe E2 est cruciale pour la neutralisation. Bien entendu, et en accord avec les données de leurs expériences préliminaires (Farci, et al.

1994), l'antisérum anti-HVRI n'apporte qu'une protection restreinte à la souche homologue et n'a aucun effet sur les mutants émergents, qui échappent ainsi à la neutralisation.

- Récemment, l'équipe d'Abrignani a développé un test quantitatif permettant d'évaluer la production d'anticorps capables d'empêcher l'attachement de la glycoprotéine E2 sur son récepteur potentiel (Rosa, et al. 1996). Dans un premier temps, ils ont montré que la glycoprotéine E2 recombinante exprimée dans des cellules de mammifères, se lie à des cellules humaines avec une haute affinité. Cette glycoprotéine a donc été utilisée lors des tests de "neutralisation d'attachement" (NOB: neutralization of binding) sur des séra humains et de chimpanzés infectés par différentes souches génotypiques du VHC. Les résultats obtenus ont mis en évidence que cette inhibition de l'attachement met en jeu au moins deux épitopes: l'un situé dans la région hypervariable I de E2, et le second localisé en dehors des régions hypervariables de E2.

Le test NOB a été utilisé ultérieurement par l'équipe de Miyamura afin de déterminer une corrélation entre la réponse immune et la rémission éventuelle de l'hépatite C chronique (Ishii, et al. 1998). Cette étude révéla que des patients atteints d'hépatite C chronique persistante ne semblent pas posséder un taux significatif d'anticorps neutralisants. Cependant, chez des porteurs chroniques montrant une rémission de la maladie, une augmentation significative des concentrations en anticorps neutralisants était observée. Cela suggère qu'une stimulation de la réponse immune chez ce type de patients permettrait de provoquer la synthèse d'anticorps NOB, susceptibles de conduire à la guérison.

2. La réponse immunitaire à médiation cellulaire

Ballardini et coll. ont mis en évidence que des hépatocytes infectés coexprimaient des molécules d'adhésion nécessaires à l'interaction virus-cellules T spécifiques (Ballardini, et al. 1995). Ainsi, les cellules hépatocytaires de patients atteints d'hépatite C chronique sont susceptibles d'exposer à la surface des antigènes viraux correspondant à des fragments de protéines du VHC. Il a été montré que chez ces patients, le taux d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) était augmenté alors que celui du CMH de classe II ne présentait pas de variation significative (Chu and Liaw 1993). Néanmoins, l'équipe de Rittner a récemment pu montrer une influence notable de l'allèle du CMHII dans la progression de l'hépatite C chronique active, suggérant l'importance de ce facteur génétique dans l'évolution de la maladie (Hohler, et al. 1997).

Beaucoup plus récemment, il a été montré que la glycoprotéine d'enveloppe E1 est transportée du réticulum endoplasmique vers le cytosol des cellules infectées par le VHC (Selby, et al. 1999). C'est dans ce compartiment qu'elle subit alors la dégradation nécessaire à la présentation de certains de ces peptides par le CMHI.

D'autre part, l'équipe de Berzofsky a observé la présentation d'antigènes originaires de la région hypervariable I de la protéine E2 par le CMHII, dans des cellules humaines infectées par le VHC (Shirai, et al. 1999). Etant donné que l'HVRI est impliquée dans la réponse humorale (voir paragraphe H.1., page 21), ce résultat donne un exemple de « réciprocité T-B » dans laquelle la proximité d'un épitope T helper détermine la spécificité de l'épitope neutralisant B.

2.1. Réponse immunitaire de type auxiliaire (lymphocytes T CD4+)

Une réponse immunitaire cellulaire de type auxiliaire CD4+ dirigée contre plusieurs des protéines du VHC a été mise en évidence chez des sujets infectés. La méthode utilisée consistait à mesurer la capacité de protéines virales recombinantes à induire la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique. Il ne semble pas encore exister de consensus quant à la définition des régions immunodominantes au sein de la polyprotéine virale, néanmoins, la protéine de capsid ainsi que les protéines NS3 et NS4 sont plus fréquemment reconnues (Botarelli, et al. 1993, Ferrari, et al. 1994, Hoffman, et al. 1995).

Des travaux récents, menés à l'aide de formes tronquées de la protéine core (C), ont permis de montrer l'importance d'un épitope situé au niveau de sa région carboxy-terminale pour la prolifération des lymphocytes T CD4+ *in vitro* (Chen, et al. 1996). De plus, ces auteurs ont montré que des souris ayant reçu une dose de ce peptide immunogène avant l'injection de protéines C produisent 64 fois plus d'anticorps que des souris témoins. Par conséquent, cet épitope apparaît important pour la stimulation de la réponse immunitaire via les lymphocytes T helper (Th). De la même manière, Shirai et coll. ont observé la prolifération de lymphocytes T CD4+ *in vivo*, suite au contact avec des peptides provenant des protéines NS5A et C du VHC (Shirai, et al. 1996).

2.2. Réponse immunitaire de type cytotoxique (lymphocytes T CD8+)

Dés 1989, Imawari et coll. décrivent la présence de lignées cellulaires T CD8+ de type cytotoxique (CTL) chez des sujets atteints d'hépatite non-A non-B (Imawari, et al. 1989). Suite à l'identification du VHC comme principal agent de ces hépatites, différents travaux démontrèrent l'existence de CTL CD8+ de spécificité antigénique similaire chez l'homme et le chimpanzé infectés chroniquement par ce virus (Erickson, et al. 1993, Koziel, et al. 1993).

Des clones de CTL CD8+ isolés de biopsies de patients atteints d'hépatite C chronique ont montré une reconnaissance spécifique d'épitopes situés sur les protéines NS2 et NS3 (Giuggio, et al. 1998). Cependant, il est à noter que la reconnaissance de ces peptides immunogènes par ces différents clones apparaît spécifique de la souche concernée.

Récemment, l'équipe de Yasutomi a mis en évidence la nécessité de la présence d'épitopes à la fois de type CTL et de type Th pour une réponse immune efficace contre la protéine C du VHC (Hiranuma, et al. 1999).

3. Conséquence de la réponse immunitaire cellulaire

Les résultats de ces études tendent à montrer que les réponses cellulaires cytotoxiques et auxiliaires apparaissent insuffisantes pour éviter le passage de la maladie en phase chronique ou pour éliminer le virus de l'organisme. Cependant, la virémie augmente sensiblement chez les patients recevant des thérapies immuno-suppressives ou coinfecteds par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ceci laisse à penser que cette réponse immunitaire intervient dans le contrôle de la réplication virale par un moyen qui reste indéterminé. Il est à noter qu'il existe différents mécanismes potentiels permettant au virus d'échapper à la réponse immune. Parmi eux, l'interférence avec la ségrégation des antigènes du MHC de classe I ou encore l'induction de la production de lymphokines sont susceptibles d'être utilisées par le VHC (Gooding 1992). Néanmoins, des résultats préliminaires portant sur l'expression des molécules du CMHI indiquent que la synthèse de la polyprotéine du VHC n'interfère pas avec l'exportation en surface de ces molécules (Dubuisson et Meunier, résultats non publiés).

L'atteinte hépatique observée dans le cas d'une l'infection par le VHC peut être due, soit à un effet cytopathique direct par le virus, soit à la conséquence de la réponse immunitaire cellulaire. Cependant, le fait que chez certains patients on observe une réplication virale sans lyse des hépatocytes, tend à montrer que la réponse cellulaire est le meilleur candidat lié à cette pathogénèse. De plus, des études morphologiques réalisées sur des foies de patients infectés par le VHC ont mis en évidence une corrélation entre le nombre de lymphocytes T CD8+ lobulaires directement au contact des hépatocytes et le taux d'ALTs (marqueur sérique de la destruction des hépatocytes), (Ballardini, et al. 1995). Un argument supplémentaire a pu être apporté par les résultats issus de traitements immuno-suppresseurs chez des chimpanzés infectés par le VHC. En effet, chez ces animaux, l'intensité de l'atteinte hépatique a pu être considérablement réduite. Les effecteurs impliqués dans ce processus inflammatoire restent cependant à préciser, car des cytokines produites par les lymphocytes T CD4+ pourraient aggraver la pathogénicité déjà induite par les lymphocytes cytotoxiques (Minutello, et al. 1993). Le rôle de la réponse immune dans la pathogénèse due à l'infection par le VHC a aussi été étudié chez l'homme. Ainsi, l'étude de biopsies de foies de patients atteints d'hépatite C chronique montrent la présence de nombreuses cellules lymphocytaires, dont les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Koziel 1997). Ces dernières produisent des cytokines qui joueraient un rôle important au niveau de l'inhibition de la réplication virale. De plus, il a été montré que des patients ayant subi une transplantation hépatique et soumis à de fortes doses d'immunosupresseurs présentent un haut taux d'expression du VHC intrahépatique, à l'origine d'effets cytopathogènes directs sur cet organe

(Jyn 1998). De même, la consommation chronique d'alcool chez des sujets atteints d'hépatite C aurait un effet suppressif non négligeable sur la réponse immune (Geissler, et al. 1997). Ces données suggèrent qu'une stratégie immunothérapeutique est aussi à prendre en compte lors du traitement de l'hépatite C chronique, afin de minimiser la pathogénicité du virus.

I. Le traitement de l'hépatite C

Le traitement de l'hépatite C chronique est essentiellement basé sur l'utilisation de l'interféron α recombinant (IFN α) qui a obtenu l'A.M.M. (autorisation de mise sur le marché) dans cette indication depuis janvier 1992, sous les noms d'Introna^R et Roferon A^R. Le mécanisme d'action de cette molécule est complexe et certains points restent encore à élucider. En résumé, l'IFN α se lie à des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire, ce qui active une voie de seconds messagers. Cette voie conduit à l'expression de nombreux gènes dont ceux des protéines Mx, des 2'-5' oligoadénylate synthétases (2-5 A), de la protéine kinase dépendante d'ARN bicaténaire (PKR), de l'oxyde nitrique synthase, et des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (pour revue, Meurs 1997). Ces protéines exercent plusieurs fonctions parmi lesquelles on trouve des activités de type antivirale, apoptotique ou encore inductrice de gènes (notamment du gène de l'IFN α par la PKR).

Selon le type de patient, le traitement prévoit l'administration de 3 à 10 millions d'unités, trois fois par semaine, pendant douze mois. Dans l'ensemble, on observe une amélioration chez 30 à 50% des patients, mais une rechute survient fréquemment après l'arrêt du traitement (de l'ordre de 50%). Les rémissions à long terme ne représentent en fait que 15 à 30% des cas traités.

Ainsi, on distingue trois groupe de patients en fonction de leur réponse au traitement par l'IFN α :

- Les Répondeurs (R), pour lesquels on observe une normalisation du taux d'ALTs sérique lors du traitement, et au delà des 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).

- Les Répondeurs rechuteurs (RR), dont la réponse favorable au traitement se caractérise par une normalisation du taux des ALTs, qui remonte néanmoins dès la fin du traitement, ou dans les six mois qui suivent. cette augmentation des ALTs est généralement corrélée avec la réapparition de l'ARN viral sérique, même si une amélioration histologique semble apparaître. Un deuxième traitement chez ce type de patients permettrait la rémission de la maladie dans 50% des cas (Chemello, et al. 1997).

- Les Non-Répondeurs (NR), pour qui il ne semble y avoir aucune réponse au traitement par l' IFN α . Ces sujets ne présentent pas de normalisation des ALTs, et il n'apparaît pas d'amélioration histologique. Un deuxième traitement ne leur est pas recommandé.

La tolérance à l'interféron est généralement bonne, cependant, il peut entraîner un syndrome grippal, des manifestations dépressives (Hunt, et al. 1997) et une activation ou amplification de désordres auto-immuns (Chung and Older 1997a, Pittau, et al. 1997). Il est également contre-indiqué dans un certain nombre de cas, comme la cirrhose, l'insuffisance rénale sévère, ou la cardiopathie sévère. D'autre part, il y aurait une corrélation entre la charge virale et la réponse au traitement. Mais c'est surtout du génotype dont semblerait dépendre l'efficacité du traitement, le type 2a étant meilleur répondeur et le type 1b étant le plus résistant (Shiratori, et al. 1997, Takagi, et al. 1997). En effet, comme il a été décrit page 15, un motif de 40 acides aminés situé sur la protéine NS5A et appelé ISDR (interferon sensitivity-determining region) serait à l'origine de cette résistance, puisque sa mutation rendrait les patients 1b sensibles au traitement par l'interféron (Enomoto, et al. 1995).

Une autre molécule, la Ribavirine est actuellement évaluée pour le traitement de l'hépatite C. Il s'agit d'un analogue de la guanosine, modifié au niveau de la base, qui exerce son action antivirale après phosphorylation intracellulaire. Elle inhibe directement la synthèse d'acides nucléiques viraux par effet de compétition avec le stock de guanosine triphosphate de la cellule infectée. Elle aurait également un effet inhibiteur direct sur l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. Cette molécule permet de faire baisser le taux d'ALTs, mais son impact sur l'histologie et sur la multiplication virale paraît moindre. C'est pour cela que son utilisation serait potentiellement intéressante en association avec l'interféron. Dans ce cadre, des études cliniques ont montré une meilleure efficacité de la bithérapie (interféron + ribavirine), pour les patients atteints d'hépatite C chronique, comparé à l'utilisation d'interféron seul (Enomoto, et al. 1995).

J. Les difficultés et les espoirs liés à l'élaboration d'un vaccin

Comme nous l'avons vu précédemment, l'efficacité du traitement de l'hépatite C par l'interféron est insuffisante, et ne permet pas d'éradiquer la maladie. De plus, la prévention sanitaire de cette maladie s'avère extrêmement difficile du fait de l'existence de cas sporadique qui concernent 30 à 40% des personnes infectées, et dont l'origine de la transmission n'a pu être identifiée. Il devient donc extrêmement urgent de mettre au point un vaccin dont le rôle serait préventif et/ou curatif (pour revue, Cahour 1998, Cahour 1995).

1. Les obstacles

L'étude de la morphogénèse du VHC n'est possible que par l'utilisation de systèmes hétérologues. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, il n'existe pas de système de culture cellulaire capable de multiplier le virus de façon efficace. Néanmoins, les méthodes d'expression utilisées (vecteurs viraux, cellules ayant intégré le génome du VHC), semblent donner des résultats similaires.

D'autre part, l'étude de la pathogénèse du VHC se fait, soit grâce au suivi de patients, soit par l'expérimentation sur le chimpanzé. L'utilisation de ce dernier est cependant très contrôlée et les caractéristiques de la réponse immunitaire induite par le virus sont sensiblement différentes de celles observées chez l'homme. L'extrapolation des résultats obtenus chez l'animal est donc très délicate, voire impossible.

Une autre difficulté est apportée par la présence de zones hypervariables sur les protéines d'enveloppe. Le taux de mutations dans les déterminants de type B des antigènes E1 et E2 est très élevé, et en particulier au niveau de la région hypervariable I de E2. Ceci entraîne donc l'apparition de virus mutants pouvant échapper à la neutralisation, car l'émergence de nouvelles quasi-espèces a lieu en continu sous la pression de sélection induite par les anticorps neutralisants (Taniguchi, et al. 1993). Cette hypothèse semble confirmée par les travaux de Farci, qui montre que l'infection par le VHC est à l'origine de la production d'anticorps neutralisants spécifiques d'une quasi-espèce virale (Farci, et al. 1994). Le développement d'un vaccin consisterait en premier lieu en l'induction d'une réponse immune dirigée contre le plus grand nombre possible de quasi-espèces.

Enfin, les maladies autoimmunes que l'on trouve chez les patients infectés par le VHC témoignent d'une stratégie potentielle supplémentaire du virus pour échapper aux défenses de l'hôte notamment par mimétisme d'épitopes de protéines cellulaires (voir page 7). De plus, il a été montré que le virus était capable d'infecter des cellules mononucléées du sang périphérique qui pourraient constituer un réservoir viral, vraisemblablement à l'origine de la réinfection des greffes. Cependant, le tropisme extrahépatique du VHC reste sujet à polémique (pour revue, Lerat and Inchauspé 1997).

2. Vers le vaccin

Malgré les difficultés rencontrées dans l'étude du virus et la compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu, l'élaboration d'un vaccin reste envisageable. Il existe en effet une protection naturelle contre le VHC, puisque l'organisme humain est capable de l'éliminer grâce à une réaction immunitaire humorale et cellulaire, qui s'avère efficace dans 20% des cas. De plus, les nombreux outils dont disposent les chercheurs leur permettent d'acquérir de plus en plus d'informations sur le virus. Ainsi, la biologie moléculaire a joué un rôle

prépondérant dans les avancées réalisées ces dernières années, notamment dès 1989 lorsque l'agent étiologique de l'hépatite C a pu être isolé (Choo, et al. 1989). Beaucoup plus récemment, un ADN complémentaire 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). Grâce à ce nouvel outil, le mécanisme même de la réplication pourrait être mieux appréhendé, et permettre la définition de facteurs viraux et cellulaires nécessaires à une propagation efficace du VHC.

Depuis que le VHC a été isolé, un grand nombre d'essais vaccinaux ont été réalisés. Les premiers antigènes utilisés pour les vaccinations ont été les glycoprotéines E1 et E2, supposées se trouver au niveau de l'enveloppe virale. C'est ainsi que les premières expériences effectuées chez le chimpanzé par Choo et coll. ont donné des résultats encourageants (Choo, et al. 1994). Les glycoprotéines E1 et E2 coexprimées à l'aide du virus de la vaccine dans des cellules HeLa ont été purifiées et utilisées pour vacciner des chimpanzés. Cinq chimpanzés sur sept étaient alors protégés contre une faible dose d'épreuve de la souche homologue. Les deux autres ont développé une hépatite aigüe qui a évolué spontanément vers la guérison. Malheureusement, les cinq chimpanzés protégés contre la faible dose d'épreuve ont tous développé une hépatite C lorsqu'ils ont été soumis à une dose d'épreuve plus forte ou mis en contact avec une souche de sous-type différent mais de même génotype. Il semble donc que la réponse immunitaire induite par la vaccination soit faible et spécifique de la souche inoculée.

La faible efficacité de la réponse immunitaire peut s'expliquer en partie par la variabilité antigénique du VHC, particulièrement imputable aux régions hypervariables présentes sur la protéine E2 (HVRI et HVRII). En effet, plusieurs auteurs ont montré que des anticorps neutralisants étaient produits contre ces régions hypervariables (Farci, et al. 1994, Zibert, et al. 1995). De plus, il s'avère qu'il est possible d'initier une immunité protectrice chez l'animal en induisant la production d'anticorps neutralisants, néanmoins, ceux-ci présentent toujours une spécificité d'action très étroite, interdisant en grande partie toute réaction croisée (Farci, et al. 1992, Farci, et al. 1994, Krawczynski, et al. 1996).

Dans le but de surmonter ce problème, Puntoriero et coll. proposent d'utiliser des "mimotopes" lors de l'étape de vaccination (Puntoriero, et al. 1998). Ce sont des peptides correspondant à des séquences en acides aminés susceptibles d'exister dans la région HVRI de E2. Les mimotopes, comme leur nom l'indique, ont la propriété de mimer la présentation des épitopes naturels pour l'interaction avec les anticorps. 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 coll. suggère par ailleurs que la variabilité des acides aminés de HVRI n'aurait pas lieu au hasard, mais serait cantonnée à quelques acides aminés (McAllister, et al. 1998).

Il est à noter que l'état conformationnel des antigènes utilisés pour la vaccination est important, afin que la réponse immunitaire soit efficace. En effet, il a été montré qu'une bonne partie des glycoprotéines E1 et E2, exprimées en culture cellulaire par des systèmes

d'expression hétérologues, forment des agrégats mal repliés (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994). Il est donc particulièrement important à l'avenir de pouvoir produire des glycoprotéines E1 et E2 dans une conformation la plus proche, sinon identique, à celle qui existe sur le virion mûre.

Une autre voie d'approche pour l'élaboration d'un vaccin consiste en l'utilisation d'"ADN nu". Le principe de cette technique est d'injecter un vecteur plasmidique exprimant des gènes d'intérêt par voie intradermique ou intramusculaire. Les protéines virales vont être exprimées de façon endogène dans la cellule, théoriquement sous leur forme native. Les vecteurs plasmidiques contenant les séquences codant les protéines d'intérêt sont placés sous la dépendance d'un promoteur fort. Cela permet ensuite de diriger la transcription de ces séquences et la traduction de ces gènes dans la cellule. Ces protéines virales seront ensuite maturées par la machinerie cellulaire en vue de leur présentation au système immunitaire.

Récemment, des résultats encourageants ont été obtenus dans le cas du virus de l'hépatite C (Inchauspé, et al. 1997, Wang, et al. 1996). Notamment, l'équipe d'Inchauspé et coll. a réalisé des injections plasmidiques 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 nécessiteraient d'être standardisés et ajustés, cette stratégie s'avère exploitable pour l'élaboration d'un traitement efficace contre l'hépatite C.

Enfin, une stratégie ayant pour but la mise au point d'un vaccin vivant recombinant est actuellement développée par A. Cahour et C. Wychowski (Cahour, 1998). Il s'agirait de produire un virus recombinant avec le VHC, qui posséderait alors les caractéristiques structurales de celui-ci, tout en utilisant la machinerie régulatrice et fonctionnelle du vecteur (le virus de la fièvre jaune) pour assurer sa multiplication. Même si de nombreux points restent encore à définir pour l'obtention d'un tel virus, ce dernier serait un excellent outil d'étude des propriétés immunologiques du VHC (base d'un test de neutralisation), et permettrait, à long terme, une ébauche de vaccin.

Chapitre II: Le réticulum endoplasmique rugueux (RER): lieu de ségrégation, de N-glycosylation, de repliement et d'assemblage des protéines

En plus du transport à travers la membrane, une variété de réactions, covalentes ou non, sont cruciales pour l'obtention d'une protéine mûre fonctionnelle. Ces réactions incluent le clivage du peptide signal, la glycosylation, la formation de ponts disulfures, le repliement, et éventuellement l'assemblage des protéines en oligomères. Ces différentes étapes de la biogenèse d'une protéine seront successivement abordées dans ce chapitre.

A. La ségrégation des protéines en voie de synthèse

La ségrégation est un processus permettant le passage à travers la membrane du RE d'une protéine en voie de synthèse, destinée à être sécrétée ou insérée dans la membrane. Ce mécanisme implique une série de protéines cytosoliques, membranaires (RE) et luminales.

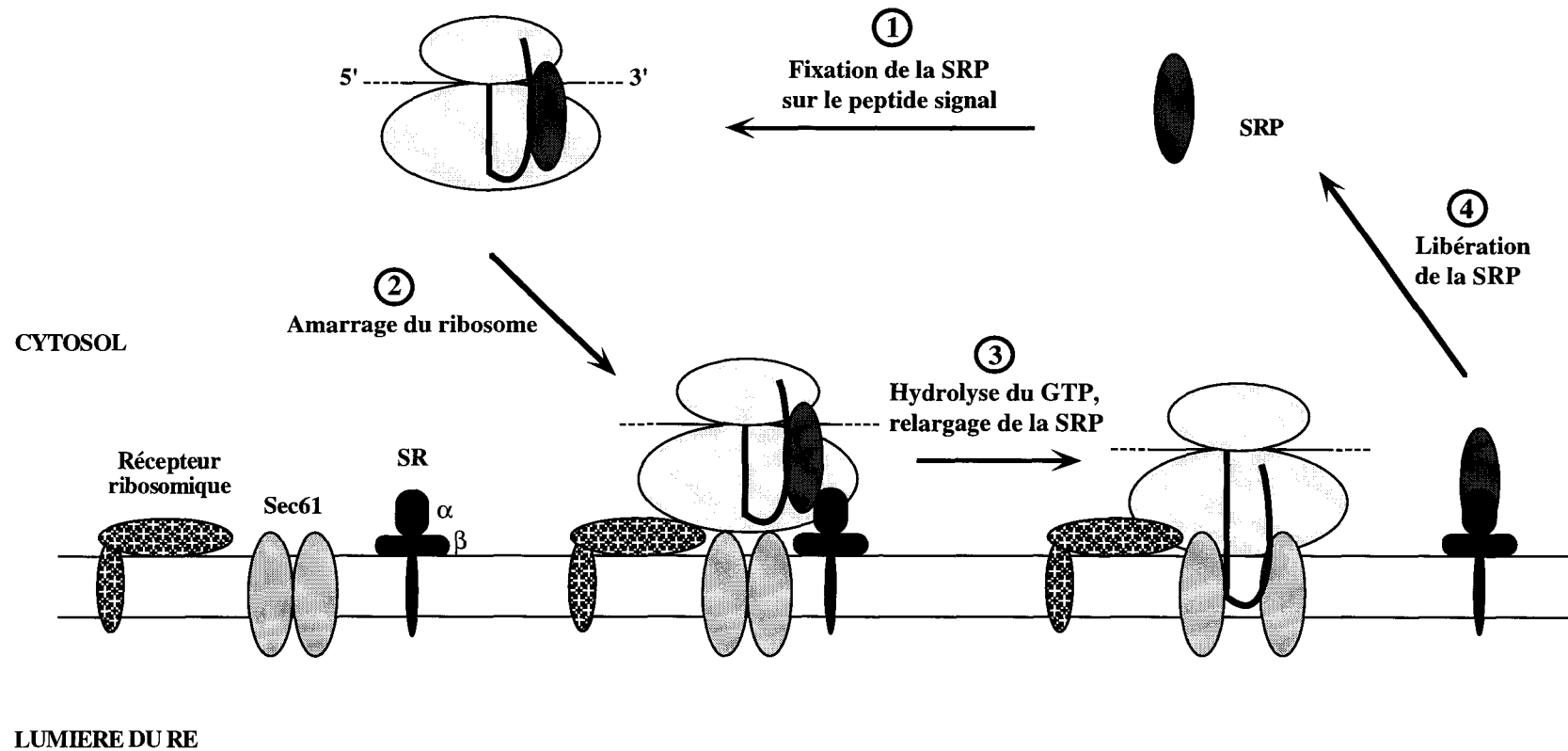
1. L'adressage de la protéine synthétisée vers la membrane du RE

Cet adressage met en oeuvre l'intervention d'une protéine soluble cytosolique et bivalente: la protéine SRP (signal recognition particule). En effet, cette protéine possède deux sites de liaison, le premier reconnaît une séquence peptidique sur la protéine en voie de synthèse (le peptide signal), et le second permet sa fixation sur son récepteur membranaire spécifique SR (SRP receptor) (Figure 13, pour revue, Lütcke 1995).

1.1. Le peptide signal

Le peptide signal est une séquence N-terminale destinée à être clivée lors du processus de ségrégation à travers la membrane du RE par un complexe pentamérique transmembranaire, la signal peptidase (Evans, et al. 1986). Cette séquence est composée de 7 à 20 résidus hydrophobes flanqués de résidus chargés, ce qui porte sa longueur totale à environ 30 acides aminés. Lorsqu'elle émerge du ribosome, et que le peptide atteint alors 70 acides aminés (le

Figure 13: Le cycle de la "SRP" (signal recognition particule), d'après Lütcke, 1995 .



ribosome recouvre approximativement 40 résidus), elle est immédiatement reconnue par la protéine SRP (Lütcke, 1995).

1.2. La protéine SRP

La protéine SRP est une particule ribonucléoprotéique composée de 6 polypeptides agencés autour d'un ARN de 300 nucléotides (Lütcke, 1995, Walter and Blobel 1980, Walter and Blobel, 1982). Des expériences de « cross-linking » ont permis de mettre en évidence l'implication de sa sous-unité de 54 kDa dans la reconnaissance du peptide signal (Lütcke, et al. 1992). Cette interaction conduit à l'inhibition de l'élongation du peptide naissant et à l'adressage du complexe ainsi formé vers la membrane du RE.

1.3. Les récepteurs du complexe ribosome-protéine-SRP

a. Le récepteur de la protéine SRP

La protéine SRP se fixe sur son récepteur SR (SRP receptor, ou docking protein), ancré dans la membrane du RE (Figure 13). Ce dernier est composé de deux sous unités α (cytosolique) et β (transmembranaire) à propriété GTPasique. En effet, après l'amarrage du complexe ribosome-SRP sur leurs récepteurs respectifs, l'hydrolyse de GTP permet la libération de la protéine SRP, laissant ainsi au peptide signal la possibilité de s'engager à travers la membrane de RE (Connolly and Gilmore, 1989).

b. Les récepteurs du ribosome

Plusieurs récepteurs potentiels nécessaires à l'ancrage du ribosome sur la membrane réticulaire ont été proposés. Les études de Savitz et Meyer, portant sur l'analyse des protéines impliquées dans la translocation au sein de protéoliposomes, démontrèrent la présence de deux récepteurs ribosomiques: p34 et p180. Dans ce modèle, la protéine p180 s'avérait alors indispensable à la fixation du ribosome, car sa déplétion au sein des vésicules liposomales entraînait une diminution importante de la ségrégation (Savitz and Meyer 1993). Cependant, Görlich et Rapoport obtinrent des résultats contradictoires puisqu'ils ne mirent en évidence aucune de ces deux protéines lors du processus de ségrégation (Görlich and Rapoport 1993).

D'autre part, la signal peptidase et l'oligosaccharyltransférase, complexes membranaires qui participent aux phénomènes cotraductionnels, apparaissent comme étant des candidats

potentiels de la liaison au ribosome (Evans, et al. 1986, Kelleher, et al. 1992). Ainsi, l'équipe de Yu a pu inhiber la ségrégation protéique en empêchant la fixation du ribosome à la membrane, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre le domaine cytoplasmique de la sous-unité ribophorine I de l'oligosaccharyltransférase (Yu, et al. 1990).

2. La ségrégation de la protéine à travers la membrane du RE

La ségrégation correspond à la reprise de l'élongation de la protéine néosynthétisée qui peut alors traverser la membrane réticulaire par l'intermédiaire du translocon.

2.1. Le translocon (Figure 14A)

Par l'utilisation de sondes fluorescentes incorporées lors de l'élongation de la chaîne polypeptidique, Crowley et coll. ont mis en évidence l'environnement hydrophile qui constitue le pore aqueux du translocon (Crowley, et al. 1994).

a. Le complexe Sec61

Des expériences de reconstitution de protéoliposomes compétents pour la translocation ont montré le rôle essentiel du complexe Sec61, aussi bien pour des protéines secrétées que membranaires (Görllich and Rapoport 1993). Le complexe hétérotrimérique Sec61 s'avère donc comme étant le constituant majeur du canal membranaire où s'effectue la traversée cotraductionnelle des protéines. Parmi les trois sous-unités qui composent ce complexe, la protéine Sec61 α interagirait directement et de façon continue avec le polypeptide engagé dans le pore aqueux (Mothes, et al. 1994).

Des travaux de microscopie électronique menés par l'équipe de Akey confirmèrent par la suite l'agencement en cylindre de plusieurs complexes Sec61, dont l'ouverture fut estimée à 20Å (Hanein, et al. 1996).

b. La protéine TRAM (translocating chain-associated membrane protein)

Cette glycoprotéine membranaire ne semble pas constituer un élément permanent du translocon. En effet, TRAM semble s'associer au polypeptide naissant, uniquement lors de son insertion dans la membrane du RE (Mothes, et al. 1994). Plus récemment, Hegde et coll. ont mis en évidence la possibilité d'une participation particulière de cette protéine dans la

Figure 14A: Représentation schématique de l'adressage et du transport d'une protéine néosynthétisée au sein de la machinerie du translocon, d'après Gilmore, 1993.

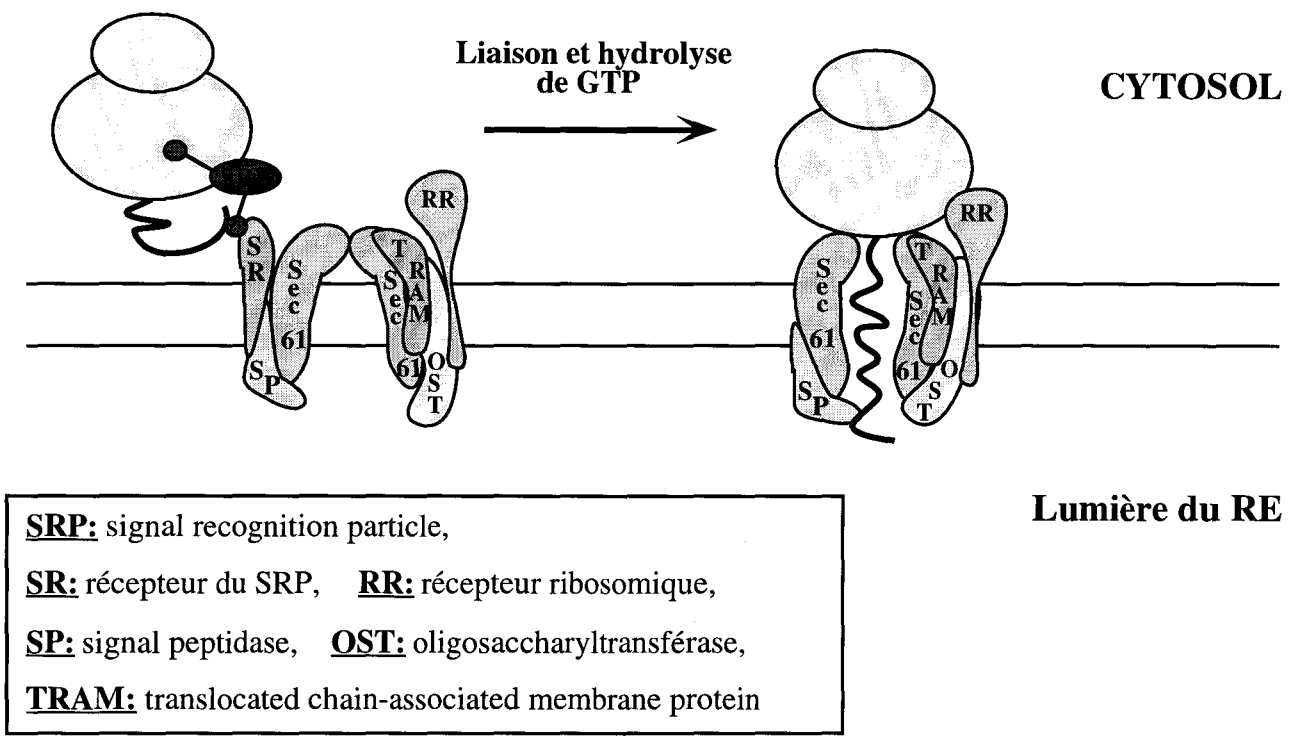
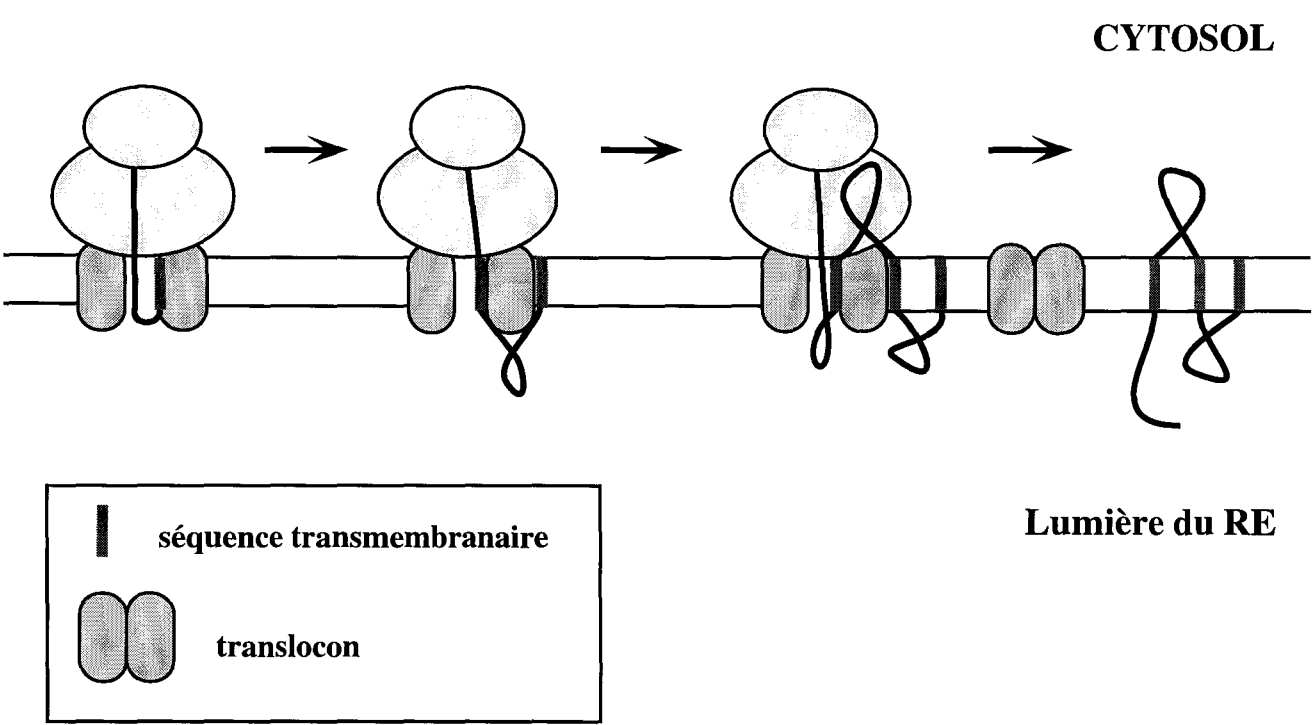


Figure 14B: Mécanisme probable de l'insertion d'une protéine membranaire, d'après Mothes et al., 1997.



ségrégation des protéines (Hegde, et al. 1998). Ainsi, TRAM se fixerait sur des domaines spécifiques de certains polypeptides naissants, afin de les protéger des facteurs cytosoliques auxquels ils seraient exposés. Ces domaines, appelés « séquences d'arrêt », proviendraient d'une pause traductionnelle qui a lieu pour certaines protéines destinées à être secrétées.

2.2. Les mécanismes de la ségrégation des protéines

Chez tous les organismes eucaryotes, le transport de la protéine synthétisée à travers la membrane du RE peut être co- ou posttraductionnel. Néanmoins, la ségrégation posttraductionnelle, qui ne nécessite pas la participation de la protéine SRP, est observée principalement au niveau des mitochondries et chez la levure (pour revue, Schatz and Dobberstein 1996, Wickner 1994). Dans les paragraphes suivants, nous parlerons donc uniquement de la ségrégation cotraductionnelle qui s'effectue au sein du RE des cellules eucaryotes supérieures.

a. Cas des protéines sécrétées

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine en voie de synthèse traverse un pore aqueux essentiellement constitué par le complexe Sec61. Cependant, l'équipe de Johnson a montré qu'il existait une régulation stricte des ouvertures cytosolique et luminale de ce pore, grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes incorporées lors de la synthèse protéique (Crowley, et al. 1994). Dans un premier temps, la fixation du complexe ribosome-protéine-SRP sur la membrane du RE permet la formation du pore ainsi que son ouverture cytosolique. Puis, dans un second temps, après avoir atteint une certaine longueur (70 résidus en moyenne), la protéine naissante devient capable de provoquer l'ouverture luminale du pore. Il est à noter que ces expériences de marquage fluorescent mettent en évidence la présence d'une boucle N-terminale au niveau la protéine en voie de synthèse.

b. Cas des protéines membranaires

Dans le cas des protéines membranaires, la ségrégation apparaît beaucoup plus complexe, étant donné l'insertion de domaines hydrophobes orientés spécifiquement à travers la double couche phospholipidique de la membrane du RE. Plusieurs mécanismes de ségrégation-assemblage ont ainsi été proposés (pour revue, Bibi 1998).

D'une manière générale, il semble que le transfert et l'insertion d'une protéine multimembranaire soient caractérisés par une succession d'arrêts de transfert, corrélés avec

l'orientation de ses différents segments dans la membrane (Gafvelin, et al. 1997). Il a été montré que la présence de résidus chargés tels que la lysine ou l'arginine au niveau de la queue N-terminale du peptide naissant conduisait à une orientation N-cytosolique du premier segment transmembranaire. A l'opposé, une queue N-terminale non chargée semble orienter le domaine transmembranaire dans le sens inverse (N-luminal).

En outre, les travaux de Mothes indiquent que le ribosome reste lié à la membrane du RE lors de la synthèse des domaines cytosolique et luminal d'une protéine membranaire (Mothes, et al. 1997). De plus, des expériences de « cross-linking » ont permis de mettre en évidence que le domaine transmembranaire, préalablement associé au complexe Sec61, est ensuite immédiatement inséré dans la membrane lipidique (Figure 14B).

c. Intervention de certains chaperons de la lumière du RER

Comme nous le verrons plus en détails dans le paragraphe C (page 53), la protéine BiP/Kar2p est un chaperon luminal qui intervient au niveau du repliement des protéines. En outre, un rôle direct dans la ségrégation posttraductionnelle des protéines sécrétées lui a été attribué chez la levure (Lyman and Schekman 1997). Cependant, la participation de BiP dans la ségrégation cotraductionnelle reste sujet à controverse. En effet, Nicchitta et Blobel ont rapporté la présence indispensable de protéines lumineales pour le transfert des chaînes naissantes dans des microsomes de cellules de mammifères (Nicchitta and Blobel 1993). Ces auteurs n'ont pourtant pas défini l'identité de ces facteurs. De plus, plusieurs équipes dont celle de Rapoport ont démenti la participation de toute protéine luminaire lors de la ségrégation cotraductionnelle, du moins au sein de protéoliposomes reconstitués de cellules de mammifères (Görlich and Rapoport 1993). Par conséquent, la présence de protéines lumineales observée par Nicchitta et coll. pourrait s'expliquer par une aide précoce au repliement (dès l'apparition lumineale de la protéine) de la part de certains chaperons tel que BiP.

B . La N-glycosylation des protéines

La N-glycosylation est le phénomène co- et posttraductionnel le plus rencontré chez les protéines membranaires. Deux fonctions majeures peuvent être attribuées aux glycannes de ces glycoprotéines (pour revue, Gahmberg and Tolvanen 1996):

- à l'intérieur de la cellule, ils aident au repliement et à l'assemblage correct de la protéine dans le RE, ainsi qu'à la migration de celle-ci vers son site fonctionnel.

- hors de la cellule, ils permettent une reconnaissance spécifique de certaines structures conduisant à l'interaction avec une variété de ligands.

Même si une variation dans la glycosylation d'une glycoprotéine donnée peut exister, notamment en fonction du type et de l'état de la cellule, les étapes de synthèse et de transfert du N-glycane sont maintenant bien établies.

1. Le glycane transféré

Lors de la N-glycosylation, le glycane transféré est toujours le même. Il est composé de 14 sucres ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) dont l'agencement s'est effectué successivement dans le cytosol puis dans la lumière du RE sur un dolichol-phosphate membranaire, d'où le nom de cycle des dolichols (Abeijon and Hirschberg 1992). La figure 15 nous montre la topographie du cycle des dolichols ainsi que le polysaccharide final obtenu.

2. Le sequon

Le sequon est le tripeptide accepteur de la protéine constitué d'Asn-X-Thr/Ser, où X est un acide aminé quelconque excepté la proline (Hart, et al. 1979). Néanmoins, la présence d'une telle séquence n'est pas suffisante pour qu'il y ait transfert du glycane. Entre autres, l'identité de l'acide aminé en position +2, l'accessibilité au site accepteur, ou encore la formation cotraductionnelle de ponts disulfures sont susceptibles de moduler la glycosylation (Gavel and Von Heijne 1990, Holst, et al. 1996).

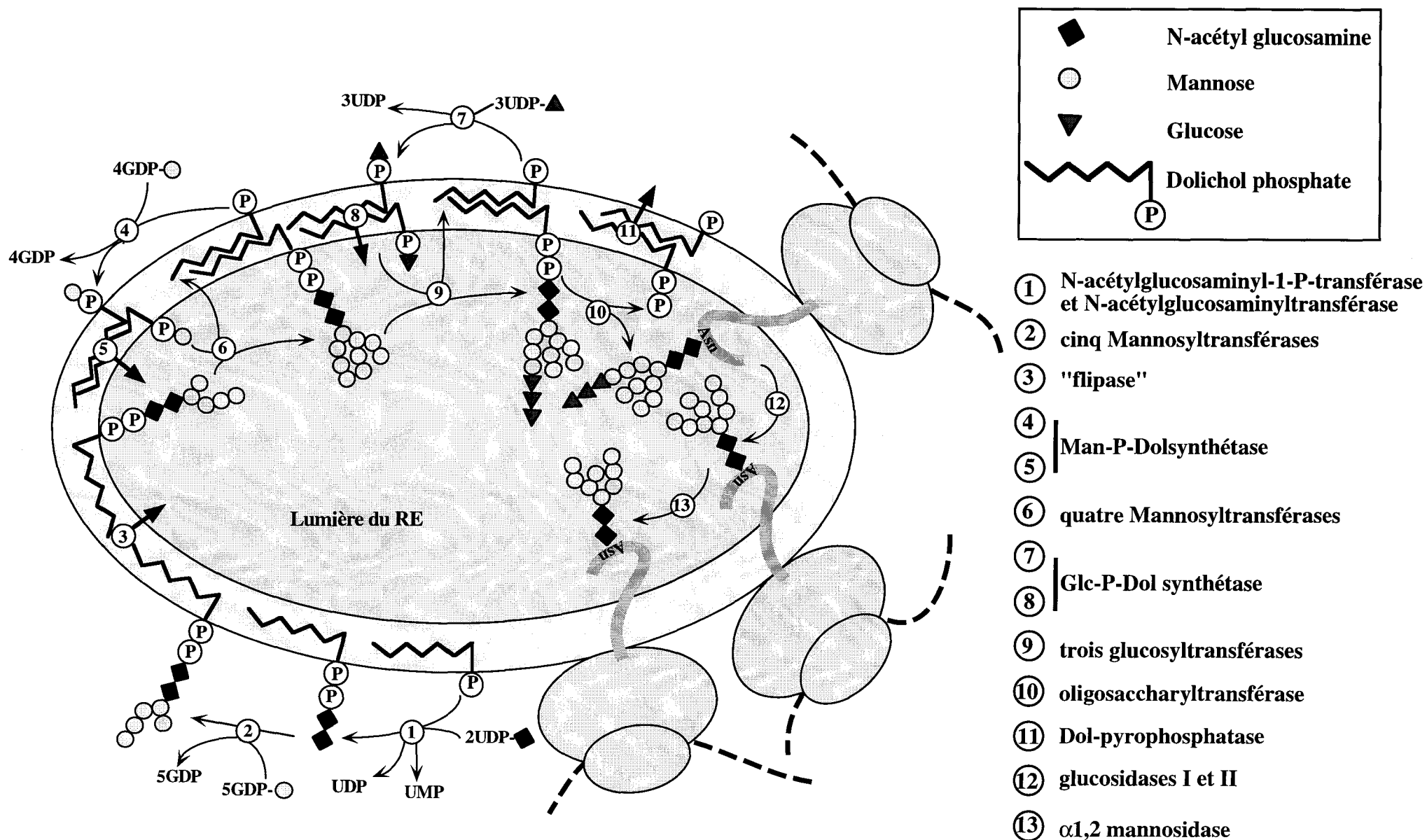
3. L'oligosaccharyltransférase

L'oligosaccharyltransférase catalyse la liaison glycosidique entre la N-acétyl glucosamine terminale du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et un résidu d'asparagine intégré dans un sequon d'une protéine synthétisée (Pless and Lennarz 1977). Il est à noter que l'oligosaccharyltransférase est un complexe protéique comprenant les ribophorines RI et RII (Fu, et al. 1997) qui interviennent aussi lors de la ségrégation des protéines en voie de synthèse (voir page 31). Ceci apporte un argument important quant à la justification du fait que la N-glycosylation est un processus cotraductionnel.

4. La maturation des N-glycosylprotéines

La maturation ou « processing » correspond à l'élimination de certains sucres suivi de l'ajout d'autres sucres sur le néoglycane transféré. Ces modifications s'effectuent de façon

Figure 15: Topographie du cycle des dolichols, d'après Abeijon et Hirschberg.



séquentielle grâce à des enzymes spécifiques à travers le RER puis l'appareil de Golgi. Cependant, il existe une compartimentation stricte de ces enzymes, ce qui confère à la glycoprotéine maturée des glycannes caractéristiques du compartiment final qu'elle a atteint. Ainsi, les glycannes de type oligomannosidique concernent les compartiments RE, ERGIC et cis-Golgi, alors que les glycannes de type N-acétyllactosaminique ou de type hybride sont issus de l'action d'enzymes *dumédian* et/ou *trans-golgiennes* (Figure 16).

C . Le repliement et l'assemblage des glycoprotéines

1. Le repliement protéique

1.1. Qu'est-ce que le repliement d'une protéine ?

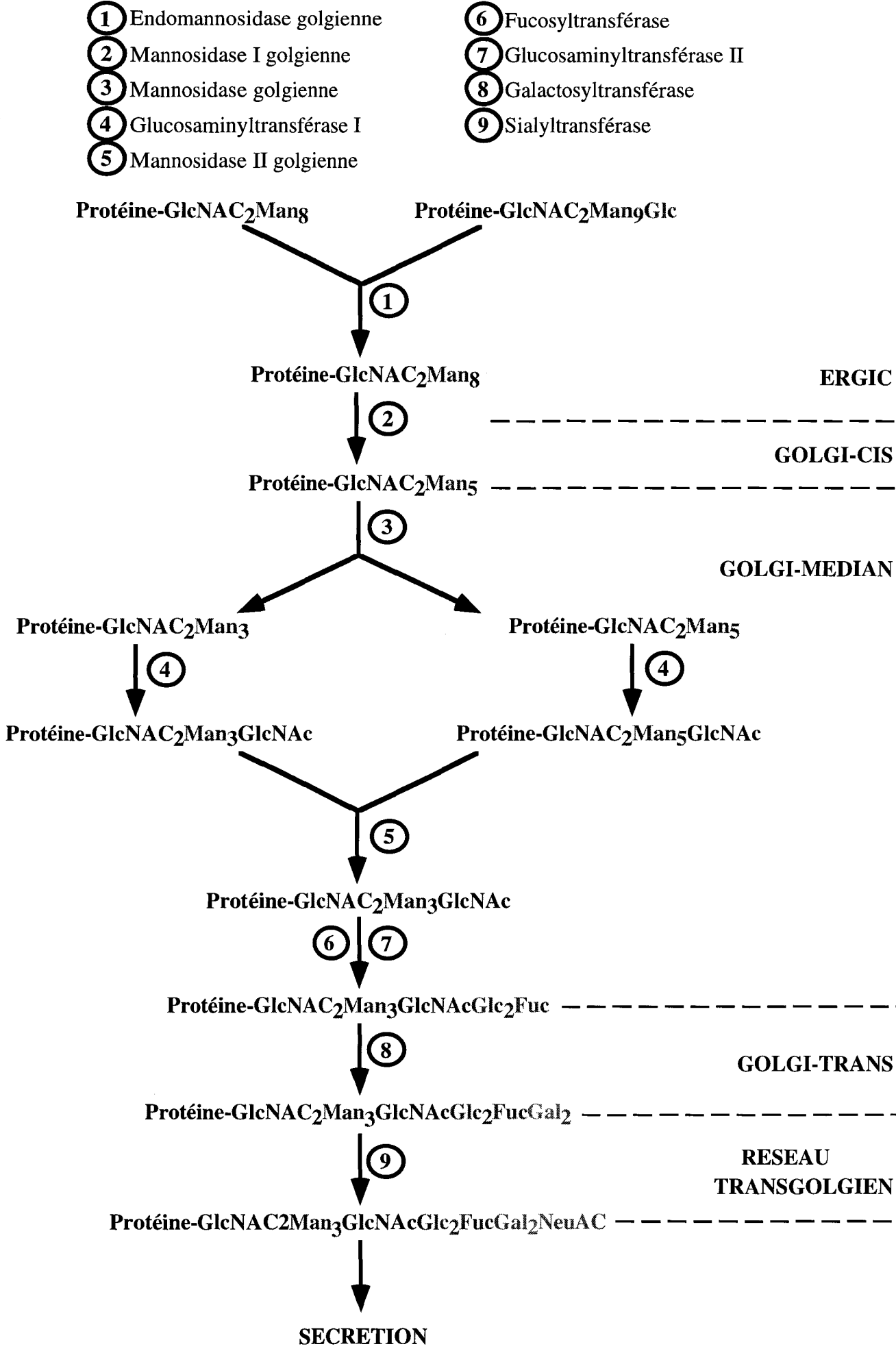
Le repliement d'une protéine correspond aux mécanismes moléculaires permettant sa mise en conformation secondaire (domaines en hélice α , feuillet β , etc...), tertiaire (agencement des domaines dans l'espace), et parfois quaternaire (association de protéines homologues ou hétérologues) conduisant à sa forme native biologiquement active. L'un des premiers pionniers qui s'intéressa au phénomène de repliement des protéines fut Anfinsen qui travailla sur le repliement réversible de la ribonucléase A *in vitro* . Il en vint à la conclusion que seule la séquence en acides aminés d'une protéine est requise pour son repliement ainsi que pour la formation correcte de ses ponts disulfures (Anfinsen 1973).

In vivo, ce processus semble beaucoup plus complexe, notamment puisque pour être efficace, il nécessite l'intervention de facteurs contenus dans le réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes. Ainsi des expériences de repliement de l'antitrypsine de pancréas bovin ou de l'hémagglutinine du virus de l'Influenza effectuées sur des fractions microsomales démontrèrent l'importance de la présence de protéines réticulaires (Marquardt, et al. 1993, Zapun, et al. 1992).

1.2. Le rôle des glycannes dans le repliement des glycoprotéines

Le rôle des glycannes, présents sur une grande majorité de protéines eucaryotes membranaires ou sécrétées, n'est pas encore totalement défini. Cependant de nombreuses fonctions ont néanmoins été suggérées (pour revue, Olden, et al. 1982). En effet, ils confèrent une stabilité protéique ainsi qu'une activité biologique et/ou antigénique correcte (Opdenakker, et al. 1993, Rademacher, et al. 1988). Les glycannes sont aussi à l'origine du repliement, de

Figure 16: Maturation golgienne des N-glycosylprotéines.



l'assemblage et de l'adressage des protéines vers leur compartiment (ou membrane) cible (Helenius 1994).

En référence au sujet de ce mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'influence des glycanes sur repliement et l'assemblage des protéines.

De nombreuses études ont montré que la glycosylation et la maturation des glycanes au sein du RE sont requis pour le repliement et l'assemblage des protéines (Fiedler et Simons 1995, Hammond, et al. 1994a, Helenius 1994). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de la glycosylation chez certaines protéines entraîne un repliement incorrect, et par conséquent la formation de larges agrégats constitués par des intermédiaires de repliement insolubles. En effet, Mirazimi et Svensson ont montré que le traitement par la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, provoque un défaut de repliement de la protéine luminale VP7 du Rotavirus, et conduit à la formation d'agrégats (Mirazimi and Svensson 1998a).

Des expériences de mutagenèse ont aussi permis de montrer l'impact des glycanes sur la maturation des glycoprotéines. Ainsi, l'équipe de Gething a introduit de nouveaux sites de glycosylation dans la séquence de l'hémagglutinine du virus de l'Influenza, et a pu constater un défaut de transport de cette protéine, dû à son mauvais repliement (Gallagher, et al. 1988). Beaucoup plus récemment dans notre laboratoire, J.-C. Meunier a pu montrer que la mutation Asn-X-Ser → Gln-X-Ser sur les sites 1 et 4 de glycosylation de la protéine E1 du VHC altérait l'assemblage des glycoprotéines E1 et E2 en hétérodimères non-covalents (Meunier, et al. 1999).

Hormis la propriété intrinsèque du glycanne qui consiste à rendre une protéine soluble en phase aqueuse et à participer à la stabilisation de sa structure, il est incontestable qu'il intervient aussi au niveau du repliement, de part son interaction avec des chaperons lectiniques du RE. En effet, comme nous le verrons plus en détails dans la suite de ce mémoire, la calnexine et la calréticuline sont capables de reconnaître spécifiquement le(s) oligosaccharide(s) monoglucosylé(s) présent(s) sur les glycoprotéines en voie de repliement, et d'assister leur repliement et leur assemblage (Trombetta and Helenius 1998, Vassilakos, et al. 1998, Ware, et al. 1995).

1.3. Le rôle du contrôle de qualité

Le contrôle de qualité correspond à l'ensemble des phénomènes de reconnaissance, de rétention et de dégradation des protéines du RE présentant un défaut de repliement ou d'assemblage, afin d'en assurer l'intégrité structurale (Hurtley and Helenius 1989a). Ainsi le contrôle de qualité organise la maturation « assistée » des protéines néosynthétisées en évitant leur sortie prématurée du RE. Pour cela, il dispose, entre autres, de chaperons moléculaires susceptibles de reconnaître spécifiquement certains déterminants conformationnels protéiques et

glycanniques dont nous discuterons dans le paragraphe 3. (page 40) (Blond-Elguindi, et al. 1993, Elliott, et al. 1997, Freedman, et al. 1994, Trombetta and Helenius 1998).

2. Le RE: un environnement favorable au repliement des protéines

Le RER procure un environnement unique dans lequel les protéines synthétisées peuvent atteindre leur structure quaternaire. C'est dans ce compartiment que les glycoprotéines vont subir les modifications nécessaires à leur maturation.

2.1. La lumière du RE est un milieu oxydant

La lumière du RE est un environnement oxydant propice à la formation ainsi qu'au maintien des ponts disulfures intra- et intermoléculaires des protéines en voie de repliement. Les facteurs susceptibles de participer à la stabilité du potentiel oxydo-réducteur sont des protéines résidentes du lumen, dont deux sont connues à ce jour: le glutathion et la protéine Ero1p.

a. Le glutathion

Hwang et coll. ont estimé que dans le RER le glutathion oxydé (GSSG) était en quantité deux fois plus importante que le glutathion réduit (GSH) (Hwang, et al. 1992). Par conséquent, ce compartiment apparaît 30 à 100 fois plus oxydant que le cytosol. Cette protéine constitue la plus abondante des molécules tampon du lumen. Cependant, le mécanisme de régénération de sa forme réduite GSH en sa forme oxydée GSSG n'est pas très clair et ferait intervenir une glutathione reductase liée au NADPH, le cycle oxydo-réducteur de la vitamine K, ou encore un système sulfhydryl oxydase (Janolino and Swaisgood 1987, Poulsen and Ziegler 1977, Vermeer 1990).

b. La protéine Ero1p

L'étude du gène ERO1 de la levure par l'équipe de Frand a permis de mettre en évidence l'implication de Ero1p dans le maintien du potentiel oxydant du RER (Frand and Kaiser 1998). En effet, la mutation de ERO1 provoque une hypersensibilité du milieu au DTT, alors que sa surexpression induit une résistance à cet agent réducteur. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par l'équipe de Weissman, qui a pu montrer que Ero1p tendait à provoquer la rétention

dans le RER des protéines sous leur forme réduite mais non native, sans affecter la maturation des protéines qui ne forment pas de ponts disulfures (Pollard, et al. 1998). Ceci suggère que cette protéine n'est pas impliquée dans la mise en conformation des protéines en voie de repliement, mais qu'elle intervient seulement, comme le glutathion, au niveau de l'oxydation des cystéines en ponts disulfures.

2.2. La lumière du RE: lieu de stockage du calcium intracellulaire

Le réticulum endoplasmique (RE) et le réticulum sarcoplasmique (RS) constituent les principaux lieux de stockage du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire (pour revue, Meldolesi and Pozzan 1998). On estime à environ $5\text{-}10 \text{ mmol}^{-1}$, la concentration de Ca^{2+} dans le RE (Krause and Michalak 1997).

Les protéines réticulaires qui lient le Ca^{2+} sont de deux types. D'une part, la calséquestrine (du RS) et la calréticuline (du RE) possèdent un domaine C-terminal acide de faible affinité mais de forte capacité de liaison au Ca^{2+} (jusqu'à 50 sites de liaison/molécule), permettant le stockage de ce cation (Campbell, et al. 1983, Michalak, et al. 1992). D'autre part, il a été montré que les chaperons BiP, grp94, Erp72, PDI et calnexine liaient le Ca^{2+} *in vitro* et que cet ion était indispensable à leur activité de repliement (Nigam, et al. 1994).

Récemment, l'équipe de Meldolesi a attribué à BiP un rôle supplémentaire de stockage réticulaire du calcium, prouvant ainsi sa participation active dans le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} dans ce compartiment (Lièvremon, et al. 1997).

La régulation de la concentration du calcium intracellulaire est à l'origine de nombreux processus physiologiques. Notamment, une faible concentration en Ca^{2+} entraînerait une accumulation de protéines incorrectement repliées dans la lumière du RE. Hendershot et coll. ont effectivement montré une perte d'activité du chaperon BiP pour le repliement protéique, dans le cas d'une déplétion en Ca^{2+} (Hendershot, et al. 1995). Le même phénomène a été observé pour la calréticuline, dont le rôle de chaperon serait en rapport avec un site unique de haute affinité au Ca^{2+} situé dans sa région médiane (Krause and Michalak 1997, Michalak, et al. 1992).

Bien sûr, de multiples autres fonctions cellulaires sont modulées par le Ca^{2+} . Parmi celles-ci, on note le transport antérograde RE-Golgi, la régulation de l'expression de certains gènes, ou encore l'initiation de la synthèse protéique, dont nous ne discuterons pas ici (Meldolesi and Pozzan 1998).

3. Chaperons et foldases: acteurs potentiels du repliement des glycoprotéines dans le RE

3.1. Origine et principe d'action des chaperons

Le nom de chaperon moléculaire fut utilisé pour la première fois par Laskey et coll. afin de décrire le rôle de la nucléoplasmine dans l'assemblage de l'ADN et des histones en nucléosomes (Laskey, et al. 1978). D'une manière générale, le terme de chaperon est actuellement utilisé pour définir une large variété de facteurs qui facilitent la génération de protéines natives et de structures nucléiques.

Les chaperons semblent agir de façon séquentielle dans la voie de repliement des protéines en s'y associant de façon exclusive ou sous forme de complexe. Ainsi, les étapes de repliement caractérisées par une liaison à un (aux) chaperon(s) suivi du relargage de la protéine se succéderont jusqu'à l'obtention de la protéine native (Frydman and Hartl 1996, Hammond and Helenius 1994b, Kim and Arvan 1995b).

La liaison entre le chaperon et la protéine en voie de repliement implique le plus souvent une interaction avec des résidus hydrophobes exposés à la surface de cette dernière. Lorsque la protéine a atteint sa forme native, ces séquences hydrophobes ne sont plus exposées, excluant toute interaction ultérieure du chaperon avec celle-ci. La liaison du chaperon à son substrat ne semble pas impliquer de séquence consensus spécifique en acides aminés mais plutôt un arrangement caractéristique de résidus hydrophobes (Flynn, et al. 1991). Le rôle de chaperon luminal a été attribué à bon nombre de protéines, dont l'identité et la fonction seront décrits dans les paragraphes suivants.

Malgré leur utilité pour la compréhension des interactions intra- et intermoléculaires qui permettent le repliement d'un polypeptide, les expériences *in vitro* ne reflètent pas exactement le processus d'obtention d'une protéine native au sein du RE (Fischer and Schmid 1990). En effet, le repliement *in vitro* apparaît inefficace et nécessite souvent des concentrations en protéines et des conditions physicochimiques très différentes de celles qui existent dans la cellule. Il est aussi important de tenir compte du fait que le repliement d'une protéine *in vivo* peut débiter de façon cotraductionnelle, dès l'apparition de la partie N-terminale de la protéine dans le lumen (Braakman, et al. 1991).

Néanmoins, depuis quelques années de nombreuses études dans ce domaine ont permis d'établir la participation de deux classes de protéines impliquées dans le processus de repliement réticulaire (pour revue, Gething and Sambrook 1992):

- la première classe de protéines concerne les enzymes conventionnelles qui catalysent la formation et/ou l'isomérisation des liaisons covalentes intramoléculaires. Ces réactions constituent des étapes limitantes dans la vitesse de repliement des protéines. Les représentants

principaux de ces « enzymes de repliement » sont la protéine disulfide isomérase (PDI) et la peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase (PPI).

- La seconde catégorie de protéines correspond aux chaperons qui stabilisent les protéines non ou partiellement repliées afin de prévenir la formation inappropriée d'interactions intra- ou intermoléculaires. De plus, certaines d'entre elles interviennent au niveau de l'assemblage en oligomères.

Les chaperons appartiennent à des familles de protéines hautement conservées, dont on retrouve les représentants aussi bien chez les procaryotes, les plantes ou les mammifères.

Nous allons décrire successivement chacune de ces protéines ainsi que leur rôle joué dans la maturation protéique au sein du RE.

3.2. Les foldases

A ce jour, deux types de foldases ont été mises en évidence dans le RE. Il s'agit des « PDI-like proteins » qui permettent la formation et l'isomérisation des ponts disulfures intramoléculaires, et de la PPI qui intervient dans la mise en conformation des liaisons X-Pro (X étant un acide aminé quelconque).

3.2.1. Les protéines "PDI-like"

Les groupements thiols et les ponts disulfures des protéines peuvent subir trois réactions chimiques distinctes: l'oxydation, la réduction et l'isomérisation, cette dernière étant rédox-indépendante (Gilbert 1994a). L'environnement du RE est oxydant, ce qui favorise la formation des ponts disulfures en plus de leur possible isomérisation (Hwang, et al. 1992). Aussi, il a été montré que la diminution de ce potentiel jusqu'à un niveau interdisant toute oxydation des groupements thiols provoquait la rétention des protéines sous leur forme réduite (Lodish and Kong 1993).

Il est maintenant admis que la formation des ponts disulfures *in vivo* implique l'intervention d'enzymes telles que PDI (Freedman, et al. 1994), et à un moindre degré ERp72 (Mazzarella, et al. 1990) et ERp57 (Hirano, et al. 1995). Ces protéines possèdent un motif CXXC commun, présent en plusieurs exemplaires, qui a préalablement été observé chez la thiorédoxine (Holmgren 1985). Chez cette enzyme réductrice du cytosol, ce motif CXXC correspond au site actif qui permet la formation et l'isomérisation de ponts disulfures.

a. PDI

La protéine disulfide isomérase est une protéine soluble de 57 kDa, dont l'abondance luminale a pu être corrélée avec la synthèse des protéines secrétées (Freedman, et al. 1989). Observée sous la forme d'homodimères dans les cellules de mammifères, sa forme monomérique possède deux domaines « thioredoxine-like » (Edman, et al. 1985), dont le rôle réducteur est maintenu par l'environnement oxydant de la lumière du RE (Hwang, et al. 1992). Chivers et coll. ont montré que le gène codant la thiorédoxine chez *Escherichia coli* était capable de compléter les mutants nuls *PDI* de *Saccharomyces cerevisiae*. Par cette manoeuvre, ces auteurs ont mis en évidence le rôle nécessaire et suffisant du motif CXXC et du milieu oxydant du lumen dans la formation des ponts disulfures des protéines (Chivers, et al. 1996). PDI apparaît donc comme étant le catalyseur le plus efficace pour l'oxydation des protéines, notamment par son abondance dans le RE (Freedman, et al. 1989).

Cependant, un rôle de chaperon moléculaire lui a également été suggéré par de nombreuses équipes. Puig et Gilbert ont montré que PDI était capable d'accélérer le repliement du lysozyme *in vitro*, et qu'à forte concentration (5 à 10 fois celle du substrat), cette foldase permettait d'éviter le mauvais repliement ainsi que la formation d'agrégats (Puig and Gilbert 1994a). Ces mêmes auteurs ont observé une activité « anti-chaperon » de PDI, lorsque celle-ci était présente en quantité substoechiométrique, ce qui conduisait alors à l'agrégation préférentielle du lysozyme.

Plus récemment, l'équipe de Svensson a montré que la protéine non structurale NSP4 du rotavirus, qui ne possède pas de ponts disulfures à l'état natif, s'associait à PDI sous sa forme déglycosylée (Mirazimi and Svensson 1998a). Ces auteurs suggèrent que cette interaction s'expliquerait par une activité de chaperon de PDI, dont le rôle serait de prévenir l'agrégation, comme il a déjà été montré pour d'autres protéines sans ponts disulfures (Cai, et al. 1994).

Dans le but de démontrer l'activité chaperon de PDI, Yao et coll. ont étudié la réactivation de la phospholipase A2 (APLA₂) dénaturée et réduite, à l'aide d'un mutant mPDI (modified PDI) qui ne possède pas d'activité isomérase (Yao, et al. 1997a). Les résultats montrent que le chaperon PDI est essentiellement impliqué dans la maturation de la APLA₂, même si une faible activité isomérase (de l'ordre de 10%) est cependant indispensable à la formation de ses sept ponts disulfures.

PDI joue aussi un rôle dans l'assemblage des protéines en multimères, comme il a été montré par l'équipe de Bulleid. En effet, PDI fait partie intégrante d'un complexe enzymatique, la prolyl-4-hydroxylase (P4H), qui catalyse la formation des résidus 4-hydroxyprolyl sur les polypeptides de collagène naissants (John, et al. 1993).

Chez la levure, PDI apparaît essentiel pour la viabilité des cellules (Scherens, et al. 1991). Néanmoins, il a été observé que la mutation nulle de PDI pouvait être efficacement compensée par un mutant PDI déficient en activité isomérase (LaMantia and Lennarz 1993). Ceci suggère

un rôle secondaire de cette activité isomérase de PDI, du moins concernant la survie des cellules de levure.

A la lumière de ces résultats, il semble que PDI, initialement caractérisée en tant que catalyseur de la formation des ponts disulfures, possède aussi une activité prédominante de chaperon.

b. ERp72

ERp72 (ER-resided p72) est une protéine soluble, résidente du RE, qui contient trois motifs « thioredoxin-like », d'où son appartenance à la famille des « PDI-like proteins » (Mazzarella, et al. 1990). Cette protéine luminale a tout d'abord été caractérisée comme une cystéine protéase. En effet, Urade et coll. ont mis en évidence l'activité protéolytique de ERp72 vis à vis de PDI et de calréticuline dans des microsomes de souris (Urade, et al. 1993). Cette protéolyse était facilement inhibée par un traitement préventif des microsomes grâce à des inhibiteurs de cystéine protéases, suggérant ainsi une implication des cystéines des motifs thiorédoxine dans l'activité protéolytique de ERp72. D'après ces mêmes auteurs, l'absence d'une telle activité chez l'archétype PDI serait due à sa structure fonctionnelle dimérique, alors que ERp72 reste sous forme monomérique à l'état natif.

La même année, l'équipe de Soling montra que la protéine analogue à ERp72 chez le rat, CaBP2 (Ca-binding protein 2), possédait une activité de protéine disulfide isomérase (Van, et al. 1993). De plus, la restauration de l'activité biologique d'un anticorps monoclonal (préalablement dénaturé et réduit) grâce à CaBP2/ERp72 permis de confirmer les résultats précédents (Rupp, et al. 1994). En outre, une étude approfondie sur la détermination du milieu oxydo-réducteur optimal nécessaire à l'activité réductrice de CaBP2/ERp72, montra que cette protéine possédait très probablement une fonction équivalente à celle de PDI au sein du RE (Lundstrom, et al. 1995).

L'implication de ERp72 dans le repliement assisté des protéines reste incertaine, même si cette protéine semble être un chaperon potentiel. En effet, l'équipe de Nigam a montré que ERp72 faisait partie d'un complexe macromoléculaire, comprenant les chaperons BiP et grp94, dont la fonction apparaît indispensable à la maturation de la thyroglobuline (Kuznetsov, et al. 1994, Muresan and Arvan 1997). Néanmoins, la thyroglobuline possède de nombreux ponts disulfures (Kim and Arvan 1991), et il n'est pas impossible que l'interaction d'ERp72 avec cette protéine soit uniquement en relation avec la formation de ses ponts disulfures.

c. ERp57

De façon plus récente, plusieurs équipes dont celle de Hirai mirent en évidence une nouvelle protéine soluble à partir d'un ADN complémentaire de la phospholipase C α (PLC): la protéine ERp57 (ER-resided p57) (Hirano, et al. 1994). En effet, la PLC fait partie d'une superfamille composée de différentes isoenzymes, et le clonage des ADN complémentaires révéla dix isoformes distinctes (Bennett, et al. 1988). Parmi elles, une isoforme ne partageait pas de similitudes de séquence avec les autres PLC déjà connues, et ne possédait pas de domaine caractéristique de liaison au calcium. Contrairement à toute attente, il s'avéra que cette protéine, très conservée chez les mammifères, avait une activité de réductase thiol-dépendante, probablement due à la présence de ses deux motifs « thioredoxin-like », identiques à ceux de PDI et ERp72 (Freedman, et al. 1989, Hirano, et al. 1994, Mazzarella, et al. 1990).

Par la suite, Oliver et coll. ont mis en évidence une interaction entre ERp57 et une glycoprotéine destinée à être sécrétée, la préprolactine (Oliver, et al. 1997). Cette interaction qui a aussi été montrée pour des glycoprotéines membranaires telle que le glycophorine C, apparaît glycanne-dépendante puisqu'elle semble nécessiter la présence de N-glycannes monoglucosylés (Elliott, et al. 1997, Oliver, et al. 1997, Van der Wal, et al. 1998). Il est cependant très probable qu'ERp57 interagit de façon indirecte, par l'intermédiaire des deux chaperons lectiniques calnexine (CNX) et calréticuline (CRT) auxquels elle se trouve très souvent associée (Elliott, et al. 1997, Rodan, et al. 1996, Sousa and Parodi 1995, Zapun, et al. 1998). Cette interaction spécifique des glycoprotéines en voie de repliement avec un complexe hétérodimérique contenant la CNX (ou la CRT) et ERp57 sera discuté plus en détails dans le paragraphe 3.3.1.-c. (page 50).

Il n'en demeure pas moins que ERp57 semble jouer son rôle de réducteur thiol-dépendant, en complément de l'activité de chaperon de la CNX et de la CRT, et participe ainsi au contrôle de qualité des glycoprotéines (Trombetta and Helenius 1998).

En outre, ERp57 pourrait exercer une fonction supplémentaire de chaperon moléculaire, de la même manière que PDI et ERp72 (Kuznetsov, et al. 1994, Puig and Gilbert 1994a). Notamment, elle a été montrée en interaction avec des protéines qui ne possèdent pas de résidus cystéine (Elliott, et al. 1997, Oliver, et al. 1997). De plus, ERp57 est une protéine régulée par le taux de glucose intracellulaire, comme le sont les deux chaperons grp78/BiP et grp94 (Hirano, et al. 1995). Ainsi, sa synthèse est rapidement augmentée dans le cas d'une privation en glucose ou d'une inhibition de la glycosylation.

3.2.2. La peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase (PPI)

Les peptidyl prolyl *cis-trans* isomérases (PPIs), encore appelées cyclophilines, sont ubiquitaires, très conservées, et connues pour leur liaison à une drogue immunosuppressive, la

cyclosporine A (Harding, et al. 1986). Entre autres fonctions, ces PPIs catalysent la *cis-trans*-isomérisation des liaisons peptidiques entre une proline et l'acide aminé situé du côté N-terminal, à l'intérieur d'une poche constituée d'acides aminés hydrophobes (Fischer, et al. 1989). Les cyclophilines sont classées en plusieurs isoformes, et parmi elles, la cyclophiline B (CyPB) d'environ 20 kDa est ségréguée dans le RE grâce à la présence d'un peptide hydrophobe N-terminal supplémentaire (Arber, et al. 1992).

La CyPB a aussi été mise en évidence dans certains fluides biologiques, suggérant ainsi un rôle particulier de cette protéine dans le milieu extracellulaire (Allain, et al. 1994, Xu, et al. 1992). Notamment, Bram et Crabtree ont montré l'implication de la CyPB extracellulaire dans la voie de transduction calcium-dépendante des cellules T du système immunitaire (Bram and Crabtree 1994).

D'autre part, Schonbrunner et Schmid ont observé une augmentation de l'efficacité de catalyse de la formation des ponts disulfures de la ribonucléase T1 par PDI, en présence de la CyPB *in vitro* (Schonbrunner and Schmid 1992). Ainsi ces auteurs suggèrent l'existence d'une interdépendance entre ces deux enzymes foldases, dans laquelle la mise en conformation préliminaire des liaisons X-P apparaît requise à l'activité de PDI.

L'équipe de Carlsson propose, pour sa part, une activité de chaperon de la CyPB dans le repliement de l'anhydrase carbonique (Freskgard, et al. 1992). Il apparaît que cette activité s'exerce au tout début du repliement de cette protéine et permet d'éviter l'agrégation, alors que l'activité isomérase s'effectue plus tardivement. Cependant, peu de travaux rapportent l'étude du rôle potentiel de chaperon de la CyPB dans le repliement des protéines, et ce rôle reste encore à confirmer.

3.3. Les chaperons moléculaires

La majorité des chaperons identifiés à ce jour appartiennent à des familles de protéines très conservées (pour revue, Gething and Sambrook 1992). Parmi elles, les chaperons lectiniques et les protéines de choc thermique sont les plus importantes, en nombre et en activité, au sein du RE. Comme nous le verrons, ces chaperons interviennent dans la reconnaissance des protéines néosynthétisées, dans la stabilisation des intermédiaires de repliement, ainsi que dans l'assemblage de ces protéines en oligomères.

3.3.1. Les chaperons lectiniques

La calnexine et la calréticuline, comme leur nom l'indique, sont des protéines réticulaires qui furent d'abord caractérisées par leur liaison spécifique au calcium (Milner, et al. 1991, Wada, et al. 1991). Il est actuellement bien établi que ces deux protéines sont deux chaperons

moléculaires qui participent à la maturation des protéines N-glycosylées en voie de repliement, grâce à une interaction de type lectinique (Ware, et al. 1995, Spiro, et al. 1996, Hammond, et al. 1994a, Hebert, et al. 1995b). Suite à la description de chacune de ces protéines, nous décrirons plus en détails leur mode d'interaction avec les glycoprotéines en voie de repliement.

a. La calnexine

Degen et Williams démontrèrent l'association transitoire d'une protéine de 88 kDa (p88) avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI), dans plusieurs lignées cellulaires de souris (Degen and Williams 1991). Par la suite, l'utilisation de mutants déficients en $\beta 2$ microglobuline ou en ligand peptidique révélèrent que les molécules du CMHI, alors incomplètement repliées et assemblées, interagissaient de façon prolongée avec p88 dans le RE (Degen, et al. 1992). Ce résultat fut crucial quant à la découverte du rôle de chaperon joué par cette protéine. En effet, son analogue humain, la protéine IP90, fut ensuite observée en association avec le récepteur des cellules T (TCR) en voie d'assemblage (Hochstenbach, et al. 1992). Finalement, plusieurs équipes dont celle de Brenner montrèrent que p88 et IP90 étaient identiques à une phosphoprotéine liant le calcium déjà connue, la calnexine (CNX) (David, et al. 1993).

L'isolement d'ADN complémentaires codant la CNX révéla qu'il s'agissait d'une protéine membranaire de type I d'environ 60kDa, possédant quatre domaines séquentiellement similaires à la calréticuline, une protéine majeure de la lumière du RE (Michalak, et al. 1992). Il est à noter qu'en SDS-PAGE (système Laemmli), la CNX migre avec une masse moléculaire apparente de 90 Kda (Degen, et al. 1992, Degen and Williams 1991, Hochstenbach, et al. 1992, Michalak, et al. 1992), alors que sur base de sa séquence en acides aminés sa masse moléculaire est estimée à 65 kDa (Wada, et al. 1991).

De nombreux travaux furent alors entrepris afin d'étudier la spécificité du substrat reconnu par la CNX. Ainsi, l'équipe de Bergeron, qui testa toute une batterie de protéines solubles synthétisées dans les cellules HepG2, proposa que la CNX interagissait préférentiellement avec des protéines glycosylées (Ou, et al. 1993). Les mêmes résultats furent obtenus lors d'études de l'interaction de la CNX avec une multitude de glycoprotéines membranaires, tant cellulaires que virales. Ainsi, l'équipe de Williams montra que le rôle majeur de la CNX vis à vis du CMHI était d'éviter sa dégradation intracellulaire et de maintenir ses intermédiaires de repliement dans le RE, afin de contribuer à la formation efficace des complexes CMHI-peptide (Jackson, et al. 1994a). Deux ans plus tard, cette même équipe montra que l'assemblage de la chaîne lourde du CMHI avec la $\beta 2$ microglobuline était cinq fois plus efficace en présence de la calnexine et que cette dernière favorisait le repliement de la chaîne lourde tout en évitant son agrégation (Vassilakos, et al. 1996).

D'autre part, Rajagopalan et coll. mirent en évidence une interaction prolongée entre la CNX et la sous unité CD3 ϵ non glycosylée du TCR dans des cellules COS (Rajagopalan, et al. 1994). Cette interaction de la CNX avec une protéine qui ne possède pas de N-glycane apparaît en contradiction avec les résultats précédents. Néanmoins, celle-ci peut s'expliquer par un taux d'expression élevé du CD3 ϵ , susceptible d'entraîner une interaction indirecte de cette protéine avec la CNX par l'intermédiaire d'autre glycoprotéines endogènes présentes dans les cellules COS (Bergeron, et al. 1994).

Enfin, la CNX semble assister le repliement et l'assemblage de glycoprotéines transmembranaires d'origine virale (pour revue, Hebert, et al. 1995a). Ainsi, diverse équipes ont montré que l'héماغlutinine du virus de l'influenza, la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire, les protéines E1 et E2 du virus de l'hépatite C, la protéine B du cytomégalo virus humain, ou encore la protéine M du virus de l'hépatite B interagissent avec la CNX (Cannon, et al. 1996, Dubuisson and Rice 1996, Tatu, et al. 1995, Werr and Prange 1998, Yamashita, et al. 1996).

b. La calréticuline

La calréticuline (CRT) fut identifiée pour la première fois dans le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (Ostwald and MacLennan 1974). Par la suite, elle fut successivement redécouverte, ce qui lui valu de nombreuses dénominations (calréguline, CRP55, « calsequestrin-like », CaBP3, Erp60) (pour revue, Krause and Michalak 1997, Michalak, et al. 1992). Cette protéine soluble d'environ 46kDa, possède un rôle non négligeable dans le stockage du Ca²⁺ du lumen, notamment grâce à son domaine C-terminal acide (voir le paragraphe C., 2.2., page 37).

La CRT partage 42 à 78% d'homologie de séquence avec la CNX, surtout au niveau d'une région médiane commune riche en proline, la région P. Cette région luminale, impliquée dans une liaison de haute affinité au Ca²⁺, a aussi été montrée comme étant le site lectinique de la CRT (Krause and Michalak 1997).

Il a été décrit que la CRT contribue à la régulation de l'adhésion cellulaire. Les travaux de Opas et coll. ont en effet mis en évidence une modulation de l'expression de la vinculine par la CRT (Opas, et al. 1996). La vinculine est en fait une protéine du cytosquelette, essentielle pour l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Cependant, de nombreux travaux tendent à montrer que la CRT joue un rôle dans le repliement assisté des glycoprotéines, au même titre que la CNX (Hammond and Helenius 1995). Ainsi, l'étude de la maturation de glycoprotéines telle que la myéloperoxydase, l'héماغlutinine ou la gp160 du virus de l'immunodéficience humaine montre une implication essentielle de CRT en tant que chaperon (Nauseef, et al. 1995, Peterson, et al. 1995, Otteken and Moss 1996a).

Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, la CNX et la CRT ont une affinité similaire pour les N-glycannes monoglucosylés, et il n'est pas rare qu'elles participent simultanément à la maturation d'une même glycoprotéine. Des exemples de coopération entre ces deux chaperons ont été décrits, notamment dans le cas du récepteur de l'insuline, de l'hémagglutinine et de la transferrine (Bass, et al. 1998, Hebert, et al. 1996, Wada, et al. 1997).

c. Modèle interactif des chaperons lectiniques

* Les preuves d'une interaction exclusivement glycanique

La CNX et la CRT ont la particularité d'être des lectines (pour revue, Trombetta and Helenius 1998). En effet, il a été montré qu'elles se lient spécifiquement aux glycannes monoglucosylés $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ des glycoprotéines néosynthétisées. Ces glycannes monoglucosylés sont obtenus à la suite de l'élimination séquentielle par les α -glucosidases I et II, des deux glucoses les plus externes du core de l'oligosaccharide initialement transféré (Figure 17, Kornfeld and Kornfeld 1985).

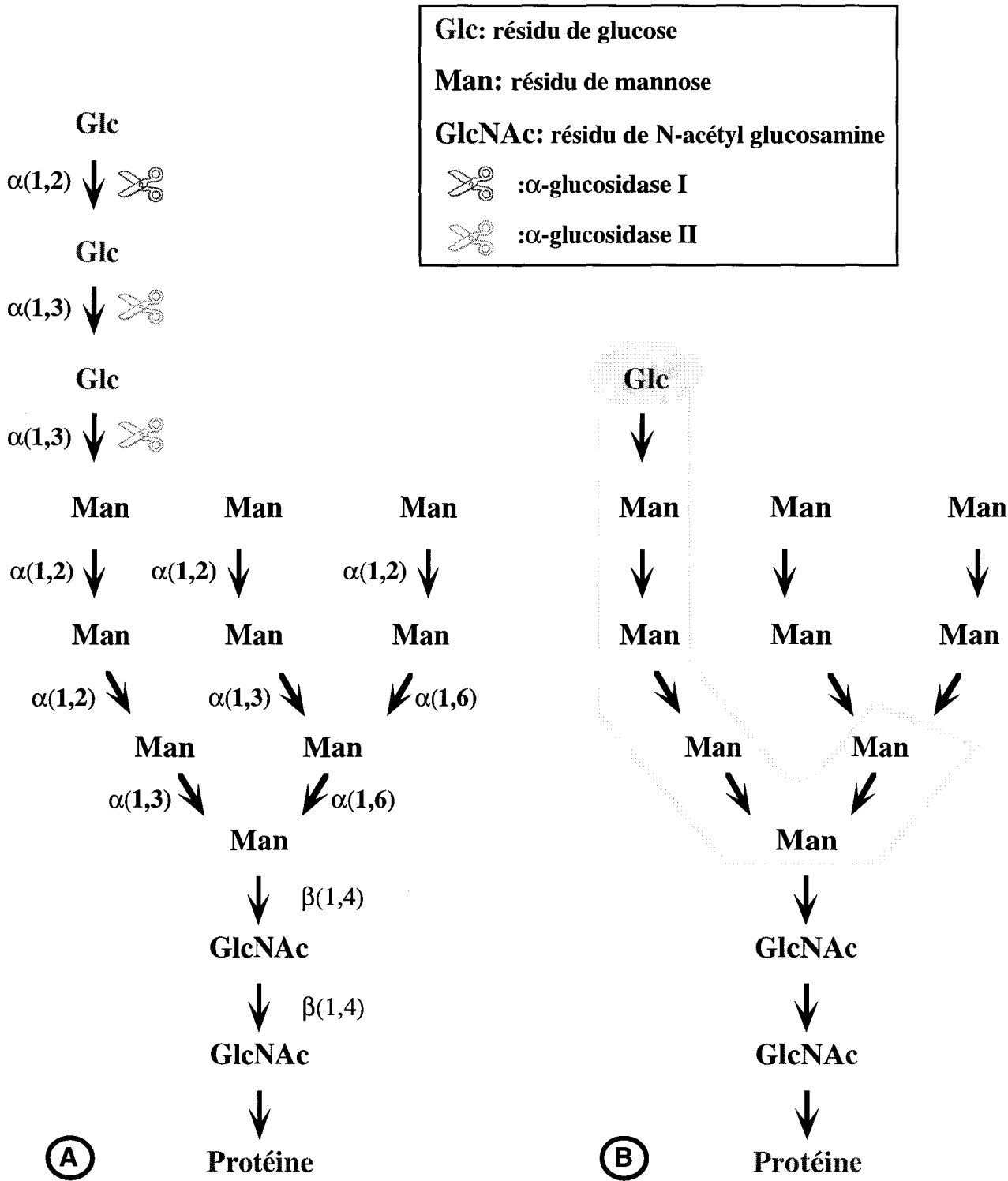
La spécificité de reconnaissance par les chaperons lectiniques CNX et CRT a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la maturation des glycannes (Nauseef, et al. 1995, Peterson, et al. 1995, Hammond, et al. 1994a, Ou, et al. 1993). Ainsi, par un traitement à la tunicamycine (un inhibiteur de la glycosylation des protéines), à la castanospermine et à la déoxynojirimycine (des inhibiteurs des α -glucosidases I et II), l'équipe d'Helenius a pu montrer que la CNX n'interagit plus avec l'hémagglutinine ou la protéine G du VSV (Chen, et al. 1995, Hammond and Helenius 1994b). En même temps, l'équipe de Williams a montré qu'en plus d'une reconnaissance spécifique du glucose terminal, la branche mannosidique qui le porte en $\alpha(1,3)$, semble aussi impliquée dans l'affinité de la liaison (Figure 17, Peterson, et al. 1995, Ware, et al. 1995). Plus récemment, Vassilakos et coll. ont mis en évidence, en utilisant des délétions successives des résidus mannose du core oligosaccharidique, que le résidu de mannose branché en $\alpha(1,6)$ était tout aussi important pour la reconnaissance (Vassilakos, et al. 1998). En outre, la CNX et la CRT peuvent s'associer de façon stable avec des protéines multiglycosylées, suggérant la présence de multiples sites de liaison aux glycannes à la surface de ces lectines (Cannon, et al. 1996, Rodan, et al. 1996).

Il n'est pas encore établi si la liaison lectinique seule est suffisante pour une interaction stable de la CNX et de la CRT avec leur substrat, ou si elle nécessite l'apport supplémentaire d'un contact de type protéine-protéine. Ainsi, il a été suggéré par Margolese et coll., suite à des expériences de « cross-linking », que la chaîne lourde du CMHI interagissait avec la CNX par le biais de son domaine transmembranaire (Margolese, et al. 1993). Néanmoins, de nombreux arguments sont en faveur d'une interaction exclusivement lectinique, localisée au niveau de

Figure 17: Structure de l'oligosaccharide reconnu par la calnexine et la calréticuline.

A: Composition et structure de l'oligosaccharide transféré sur les protéines dans le RE.

B: Oligosaccharide issu de l'action de l' α -glucosidase I et de l'action partielle de l' α -glucosidase II. Le glucose terminal est essentiel pour la reconnaissance par la CNX et la CRT, mais des résidus de mannose semblent aussi influencer l'interaction (entourés en gris sur le schéma). Pour revue, Trombetta et Helenius, 1998.



l'ectodomaine. En effet, il a été montré que la CNX se lie à de nombreuses protéines solubles (Ou, et al. 1993), et que des recombinants n'exprimant que l'ectodomaine de la CNX étaient capables de se lier à leur substrat glycoprotéique (Rajagopalan, et al. 1994, Ware, et al. 1995). Cependant, il n'est pas impossible que l'interaction de ces chaperons lectiniques se fasse en deux temps. Ainsi, la reconnaissance préalable des glycanes du substrat par la CNX ou la CRT serait suivie d'une stabilisation de l'interaction par un contact de type protéine-protéine.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la spécificité de reconnaissance lectinique de la CNX et de la CRT apparaît similaire pour ces deux protéines (Spiro, et al. 1996, Vassilakos, et al. 1998, Ware, et al. 1995). Néanmoins, l'étude du repliement et de l'assemblage du TCR montre une association différente avec la CNX et la CRT des sous unités qui le composent (van Leeuwen and Kears 1996c). En effet, alors que la CNX se lie aux sous unités α , β , δ et ϵ , la CRT interagit uniquement et de façon plus transitoire aux sous unités α et β . De plus, il a été montré que les chaînes lourdes du CMHI chez la souris s'associent très tôt avec la CNX, et de façon plus tardive avec la CRT (Harris, et al. 1998). D'autre part, lors du repliement de l'hémagglutinine, les formes précoces se lient aux deux chaperons CNX et CRT, alors que les formes tardives s'associent uniquement à la CNX (Hebert, et al. 1997). Dans ce dernier cas, la liaison de la CRT semble restreinte aux sucres localisés dans les domaines les plus rapidement repliés de la glycoprotéine, qui sont peut être aussi les plus accessibles pour cette protéine soluble. Ces résultats suggèrent qu'il existe une complémentarité d'action entre la CNX et la CRT, mais aussi une spécificité d'interaction vis à vis du substrat, qui pourrait s'expliquer par leur localisation ainsi que leur disponibilité spaciales au sein du RE.

* L' α -glucosidase I et l' α -glucosidase II

Lors de la N-glycosylation des protéines, l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est transféré sur le polypeptide naissant (voir paragraphe **B.3.**, page 35). Immédiatement après ce transfert, commence le processus de maturation du glycanne dans le RE. La glucosidase I, une enzyme membranaire, élimine le glucose terminal lié en α -1,2, puis la glucosidase II, une enzyme soluble, enlève les deux glucoses restant liés en α -1,3 (Figure 17, Kornfeld and Kornfeld 1985). Les glycoprotéines monoglucosylées, ayant subi l'action de la glucosidase I ainsi que l'action partielle de la glucosidase II (élimination d'un glucose sur les deux glucoses restants), constituent des substrats de choix pour la CNX et la CRT qui peuvent alors exercer leur rôle de chaperon (Helenius 1994).

* L'UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase

L'UDP-Glc:glycoprotéine glucosyltransférase est une enzyme soluble du RE, qui fut découverte dans des membranes microsomales de foie de rat (Trombetta, et al. 1989, Trombetta, et al. 1991). Des expériences de marquage radioactif à l'aide de l'UDP-[¹⁴C]Glc montrèrent que cette enzyme catalyse le transfert de glucose, à partir du donneur UDP-Glc, sur un accepteur glycoprotéique luminal possédant le motif oligomannosidique Man_{7,9}GlcNAc₂ (Trombetta, et al. 1989). Ces espèces oligomannosidiques sont produites lors de la maturation des glycanes suite à l'action des α -glucosidases I et II, et de mannosidases réticulaires (voir paragraphe précédent).

Il a de plus été observé *in vitro*, que cette réaction de glucosylation s'effectuait sur des glycoprotéines n'ayant pas encore atteint leur état natif (Sousa, et al. 1992, Trombetta and Parodi 1992). De toute évidence, l'UDP-Glc:glycoprotéine glucosyltransférase n'agit que sur un substrat qui possède un ou plusieurs domaine dénaturés, et constitue en quelque sorte un « senseur » qui reconnaît sélectivement les protéines non natives (Hammond, et al. 1994a, Sousa, et al. 1992). En effet, cette enzyme interagirait avec son substrat via la N-acétylglucosamine proximale du N-glycane (branchée sur le polypeptide) ainsi que des acides aminés hydrophobes exposés en surface, ces derniers étant caractéristiques d'une protéine incomplètement repliée (Sousa and Parodi 1995). De plus, il a été montré que la CNX et la CRT se fixent sur les glycoprotéines monoglucosylées quel que soit leur niveau de repliement (Rodan, et al. 1996). Par conséquent, ces deux chaperons seraient incapables de détecter l'état conformationnel d'une protéine en voie de repliement, et se limiteraient à la reconnaissance exclusive de son (ou ses) glycane(s) monoglucosylé(s).

* ERp57: un nouvel acteur du cycle de repliement des glycoprotéines

Une nouvelle dimension quant à la fonction de la CNX et de la CRT a récemment émergé grâce à la découverte d'ERp57. En effet, en présence d'agent « cross-liant », ERp57 a pu être coimmunoprécipitée avec des glycoprotéines partiellement déglucosylées (Oliver, et al. 1997). De plus, en présence de castanospermine (inhibiteur des α -glucosidases I et II), Erp57 devient incapable d'interagir avec des glycoprotéines nouvellement synthétisées (Van der Wal, et al. 1998). Il a donc été postulé que la CNX et la CRT recrutent les glycoprotéines monoglucosylées alors susceptibles de subir une réduction de leurs groupements thiols en ponts disulfures, par l'intervention d'ERp57. L'évidence d'une coopération entre deux de ces protéines (la CNX ou la CRT et ERp57) fut récemment observée lors du repliement oxydatif, catalysé par Erp57 de la ribonucléase B monoglucosylée (Zapun, et al. 1998). Cependant, il a été montré que la CNX ou la CRT médiait aussi l'interaction d'ERp57 avec des glycoprotéines

solubles ou membranaires ne possédant pas de résidus cystéines (Elliott, et al. 1997, Oliver, et al. 1997). Par conséquent, cela suggère qu'ERp57 aurait une fonction supplémentaire de chaperon thiol-indépendant qu'elle pourrait exercer directement ou par l'intermédiaire d'autres facteurs de repliement.

* Modèle de repliement des glycoprotéines

Un modèle de glucosylation-déglucosylation des glycoprotéines mettant en scène la CNX et la CRT ainsi que les enzymes luminales de la maturation des N-glycannes fut élaboré par Hammond et Helenius en 1995 (Hammond and Helenius 1995). Ce modèle hypothétique schématisé dans la figure 18 permet de comprendre certaines étapes du repliement d'une glycoprotéine. Ainsi, après l'action de l' α -glucosidase I et l'action partielle de l' α -glucosidase II, la glycoprotéine monoglucosylée est rapidement reconnue par la CNX ou la CRT. Le chaperon lectinique stabilise alors son substrat, qui peut alors subir des changements conformationnels correspondant à son repliement. La dissociation du complexe glycoprotéine-chaperon est ensuite induite par l'action de l' α -glucosidase II qui élimine le dernier résidu de glucose lié en α -1,3. La N-glycoprotéine ainsi générée aura le choix entre deux voies possibles suivant l'état conformationnel qu'elle aura atteint:

- si cette glycoprotéine ne possède pas encore sa conformation finale, elle est reconnue par l'UDP-Glc: glycoprotéine glucosyltransférase qui la reglucosyle. La glycoprotéine pourra alors s'engager à nouveau dans une interaction lectinique et recommencer le cycle plusieurs fois jusqu'à l'obtention de sa forme native.

- si cette glycoprotéine est correctement conformée, elle n'est plus accessible à l'UDP-Glc: glycoprotéine glucosyltransférase et peut alors s'engager vers sa destinée finale.

Enfin, la mise en évidence de la participation de la réductase thiol-dépendante ERp57 dans le repliement des glycoprotéines a permis de compléter le modèle précédent (figure 19, Elliott, et al. 1997, Van der Wal, et al. 1998, Zapun, et al. 1998). Etant donné que la CNX et la CRT ne semblent pas être directement impliquées dans la mise en conformation des glycoprotéines, ce rôle semble revenir à ERp57, qui permettrait la formation des ponts disulfures. Ainsi, ERp57 posséderait un domaine de reconnaissance spécifique sur les deux lectines, lui permettant d'accomplir son action oxydante.

Figure 18: Modèle de repliement assisté des glycoprotéines par les lectines calnexine et calréticuline dans le RE.
(pour revue, Trombetta et Helenius, 1998)

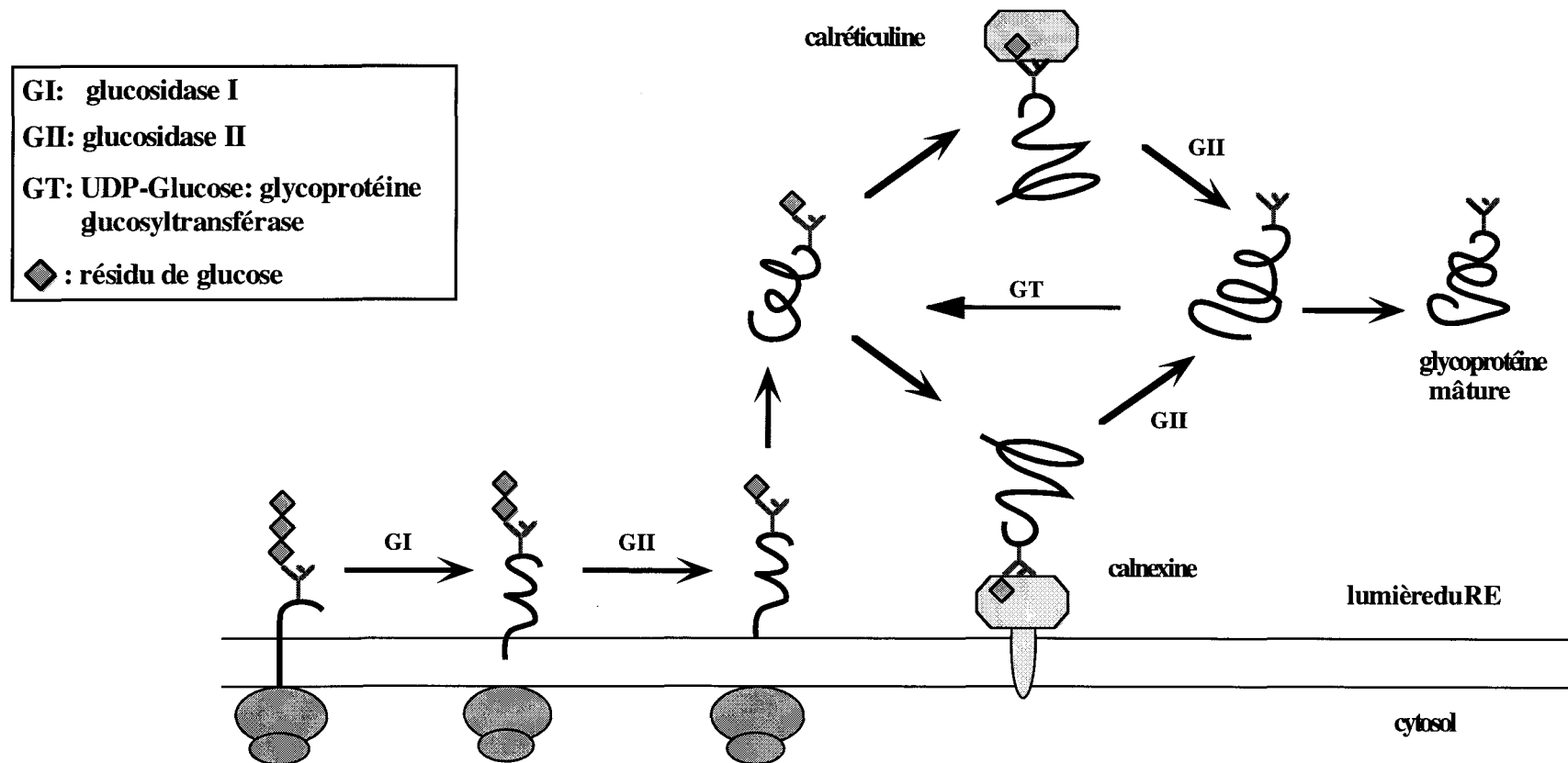
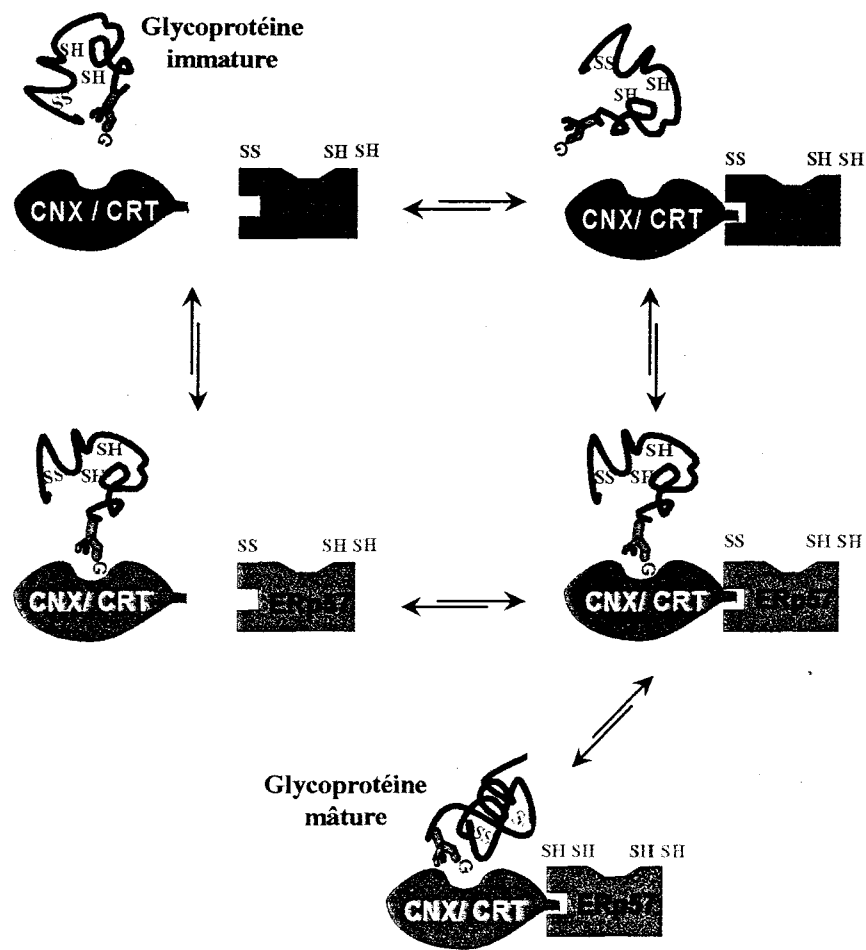


Figure 19 : Rôle potentiel de ERp57 dans le repliement des N-glycosylprotéines au cours du cycle de déglucosylation-reglucosylation (d'après Zapun *et al.*, 1998)



CNX : Calnexine
CRT : Calréticuline
ERp57 : ER-resident protein 57
⌘ : Glycane monoglucosylé

d. Les inhibiteurs de la maturation des glycanes comme agent anti-viraux

Nous avons vu que les oligosaccharides jouent un rôle primordial dans la destinée des glycoprotéines. Ainsi, le cycle de déglycosylation-reglycosylation apparaît être le passage obligé de nombreuses protéines pour l'obtention de leur conformation native. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs de la glycosylation, notamment pour l'élimination de pathogènes intracellulaires, a été l'objet de nombreux travaux ces dernières années.

Plusieurs laboratoires se sont plus particulièrement penchés sur le cas des virus (pour revue, Mehta, et al. 1998). En effet, les virus animaux peuvent posséder une enveloppe virale, qui comprend la plupart du temps une ou plusieurs glycoprotéines, souvent essentielle(s) au cycle infectieux viral (assemblage, sécrétion, infectivité). Le repliement et l'assemblage de ces glycoprotéines virales a lieu via la machinerie cellulaire et implique par conséquent la participation de la CNX et/ou de la CRT, comme il a été montré pour le VIH, le VHC ou le VHB (Dubuisson and Rice 1996, Otteken, et al. 1996b, Werr and Prange 1998). L'éradication de ces trois virus constitue en effet l'une des préoccupations majeures de santé publique dans les pays développés. Etant donné l'absence d'un système de culture cellulaire capable de permettre une réplication efficace du VHC, les études portant sur l'action des inhibiteurs de glucosidase sur le cycle viral ont surtout été menées pour le VIH et le VHB.

Le VIH code deux glycoprotéines d'enveloppe, gp41 et gp120, hautement glycosylées (Hansen 1992). La gp41 sert d'ancrage membranaire à la gp120, qui lui est associée de façon non-covalente. Lors de l'infection, la gp120 se fixe sur son récepteur cellulaire CD4. Cette fixation provoque un changement conformationnel de cette glycoprotéine virale, suivi de sa dissociation de gp41, permettant ainsi l'exposition de cette dernière en surface. Ainsi, la gp41 peut exercer son rôle dans la fusion membranaire, et donc l'entrée du virus dans la cellule (McCune, et al. 1988). Le traitement par la N-butyl-déoxinojirimycine (NB-DNJ), un inhibiteur de l' α -glucosidase I, de cellules infectées par le VIH-1 a montré un défaut d'entrée des virus néoformés dans les cellules hôtes (Karpas, et al. 1988). Une étude plus poussée menée par l'équipe de Platt a révélé que le blocage de l'entrée du virus se situait lors d'une étape ultérieure à la fixation de la gp120 sur son récepteur (Fischer, et al. 1995). La même équipe a mis en évidence un an plus tard que la gp120 générée dans ces conditions était incapable d'effectuer son changement de conformation et de se dissocier de la gp41 (Fischer, et al. 1996a). Il s'avéra en fait que la gp120 présentait un défaut de conformation, comme cela fut montré à l'aide d'une batterie d'anticorps conformation-dépendants (Fischer, et al. 1996b). Ainsi, la NB-DNJ induit un mauvais repliement de la gp120 (et probablement de la gp41) en provoquant un arrêt de la maturation de ses glycanes. La conséquence de ce phénomène ne semble pas se faire ressentir sur le bourgeonnement viral, mais plutôt sur la fusion ultérieure des virus, ce qui constitue une étape importante du cycle viral.

Dans le cas du VHB, l'effet de la NB-DNJ apparaît plus drastique, puisqu'elle conduit à l'inhibition de la sécrétion des particules infectieuses (Block, et al. 1994). Le VHB possède trois protéines d'enveloppe faiblement glycosylées (L, M et S) dont l'une d'entre elles, la protéine M, semble jouer un rôle important dans la morphogénèse du virus. En effet, l'équipe de Dwek a montré que la mutation d'un site de glycosylation de M, situé dans un domaine particulier appelé pré-S2, provoquait l'inhibition de la sécrétion du VHB (Mehta, et al. 1997). Récemment, ces résultats furent confirmés par Werr et Prange qui mirent en évidence l'association de ce glycanne avec la CNX (Werr and Prange 1998). L'interaction de cette lectine est en outre facilement abolie lors du traitement des cellules infectées par la tunicamycine ou la NB-DNJ, ainsi que par l'utilisation de mutant non glycosylés.

D'autres virus tels que le BVDV (bovine viral diarrhea virus) sont aussi sensibles aux inhibiteurs de glucosidase (Mehta, résultats non publiés). Ce virus (BVDV) s'avère particulièrement intéressant puisqu'il appartient à la même famille que le virus de l'hépatite C, et pourrait par conséquent servir de modèle pour ce dernier. Ainsi, étant donné l'existence de similitudes entre ces deux virus du point de vue de leur organisation génomique, de leur stratégies potentielles de réplication, et du site d'assemblage viral probable, il apparaît plausible que les effets des inhibiteurs de glucosidase sur leur cycle viral soient identiques.

3.3.2. Les protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (hsp: heat shock protein) furent découvertes lors de stress cellulaires tels que l'hyperthermie, la présence d'agents toxiques, ou encore la déplétion en glucose (Munro and Pelham 1985). Parmi ces protéines, la grp78 et la grp94 (glucose-regulated protein de 78 et 94 kDa) sont les représentants les plus abondants du RE, dans lequel elles sont exprimées de façon constitutive (Brewer, et al. 1997, Welch 1987).

A l'origine, ces protéines participent au mécanisme de lutte contre l'agrégation des protéines cellulaires mis en place au sein des cellules soumises à des conditions de stress (Pelham 1986). Néanmoins, de nombreuses études ont montré le rôle joué par ces grp dans la maturation des protéines de cellules non stressées.

a. BiP

Grp78 est une protéine soluble du lumen aussi appelée BiP (binding immunoglobulin protein), puisqu'elle fut mise en évidence pour la première fois en association avec les chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les cellules précurseurs de lymphocytes B (Haas and Wabl 1983).

Plusieurs indices ont permis de suggérer que BiP joue un rôle de chaperon dans le repliement et l'assemblage des protéines. Ainsi, Bole et coll. ont montré une association prolongée des chaînes lourdes d'immunoglobuline avec BiP, jusqu'à ce que les chaînes légères s'y associent (Bole, et al. 1986). De la même manière, l'ajout de chaînes légères d'immunoglobulines à des cellules en culture qui synthétisent des chaînes lourdes (cellules pré-B transformées par le virus Abelson) provoque le relargage de ces dernières de la protéine BiP et l'assemblage des immunoglobulines, alors sécrétées dans le surnageant (Hendershot 1990). Une preuve indirecte a aussi pu être donnée par le fait que la synthèse de BiP est induite par l'augmentation de la quantité de protéines cellulaires mal repliées (Dorner, et al. 1989). Mais les meilleurs arguments ont été apportés par les nombreux travaux effectués sur les protéines virales. En effet, BiP a été mis en évidence en association avec les formes non repliées du précurseur de l'hémagglutinine (HA0) du virus de l'Influenza (Hurtley, et al. 1989b). Parmi ces intermédiaires de repliement, les formes mal repliées du précurseur HA0, sont retenues dans le RE grâce à BiP, puis dégradées, suggérant un rôle à part entière de ce chaperon dans le contrôle de qualité. L'équipe de Doms a montré une association transitoire et spécifique de la protéine gp160 du VIH avec BiP lors de son séjour dans le RE (Earl, et al. 1991). Pour leur part, Mulvey et Brown ont décrit l'implication de BiP dans la maturation et l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe E1 et PE2 du virus Sindbis (Mulvey and Brown 1995). Enfin, il n'est pas rare de constater la participation séquentielle et/ou simultanée d'autres chaperons du RE dans la mise en conformation des protéines virales ou cellulaires. Ainsi, une action séquentielle de BiP et de CNX a été mise en évidence lors du repliement de la protéine G du VSV, de la thyroglobuline, ou encore de la glycoprotéine du virus de la rage (Gaudin 1997, Hammond and Helenius 1994b, Kim and Arvan 1995b). De la même manière, les chaperons BiP et grp94 peuvent agir séquentiellement dans le repliement des protéines, comme cela a été montré dans le cas des chaînes d'immunoglobulines ou des protéines structurales du Rotavirus (Melnick, et al. 1994, Xu, et al. 1998).

L'ensemble des résultats précédents a permis de mettre en évidence une affinité particulière de BiP pour les protéines en voie de repliement ou incorrectement repliées. Machamer et coll. ont ainsi pu montrer une interaction spécifique de BiP avec les intermédiaires de repliement de la protéine G du VSV, dont les ponts disulfures n'étaient que partiellement formés. En fait, il s'avère que BiP possède un domaine de liaison aux peptides (Flynn, et al. 1989) qui reconnaît spécifiquement les résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes (Blond-Elguindi, et al. 1993). Ces peptides hydrophobes sont exposés à la surface d'une protéine uniquement lorsque celle-ci n'a pas atteint sa forme native, ce qui permet à BiP de s'y fixer afin d'éviter la formation d'agrégats ou d'interactions non productives.

De plus, il a été montré que le repliement d'une protéine « chaperonnée » par BiP s'effectuait par une série d'associations-dissociations, grâce au domaine ATPasique de cette dernière (Munro and Pelham 1986). Cependant, les équipes de Fink et Hendershot ont montré que la fixation de l'ATP sur ce chaperon, indépendamment de son hydrolyse, suffisait à assurer

le relargage de la protéine associée (Figure 20, Palleros, et al. 1993, Wei, et al. 1995a). Par conséquent, l'ajout d'ATP dans un lysat cellulaire suffit à provoquer la dissociation d'un substrat préalablement associé à BiP, alors que la déplétion en ATP (par le carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone ou l'apyrase) conduit à la stabilisation de l'interaction (Hurtley, et al. 1989b, Kim and Arvan 1995b, Mulvey and Brown 1995).

b. GRP94

La protéine grp94 est un homologue de la protéine de choc thermique hsp90 du cytosol (Sorger and Pelham 1987). Sur base de l'analyse de sa séquence nucléique, grp94 possède un domaine transmembranaire potentiel, mais une forme luminale mono- et dimérique de cette protéine a aussi pu être observée (Kang and Welch 1991, Melnick, et al. 1994, Wearsch and Nicchitta 1996).

Comme pour BiP, grp94 a été mise en évidence en association avec des substrats protéiques non assemblés, suggérant qu'elle jouerait aussi un rôle de chaperon. Ainsi, Melnick et coll. ont coprécipité grp94 avec les chaînes légères et les chaînes lourdes d'immunoglobulines (Melnick, et al. 1992). Des travaux ultérieurs leur permirent de montrer que grp94 et BiP interagissaient séquentiellement lors de l'assemblage des immunoglobulines (Melnick, et al. 1994). En effet, contrairement à BiP qui interagit très tôt, grp94 semble s'associer plus particulièrement avec les formes oxydées des chaînes lourdes et légères, qui correspondent aux stades finaux de leur repliement précédant l'assemblage de l'immunoglobuline.

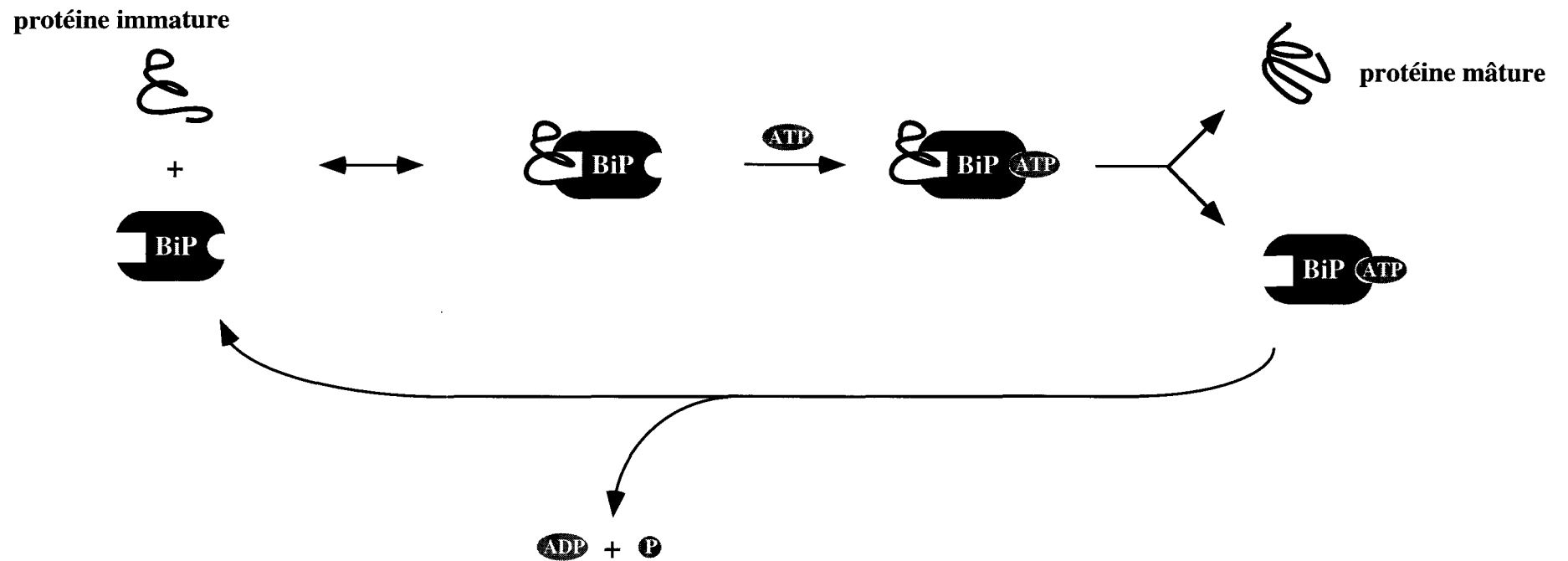
4. L'assemblage des protéines en oligomères

L'assemblage des protéines en oligomères est un phénomène posttraductionnel qui, dans la majorité des cas, nécessite que les protéines concernées aient atteint leur conformation native. Ainsi, Hebert et coll. ont montré que la trimérisation de l'hémagglutinine n'avait lieu qu'en présence de formes totalement oxydées considérées comme natives (Hebert, et al. 1996). Il existe cependant des cas particuliers comme celui du virus parainfluenza, où l'assemblage s'effectue avant l'oxydation totale des ponts disulfures (Collins and Mottet 1991).

4.1. Lieu d'assemblage des protéines

Le RE et/ou le compartiment intermédiaire semblent être les lieux d'assemblage des protéines. En effet, de nombreux travaux ont montré que les oligomères néoformés ne possèdent pas de glycannes de type complexe, caractéristiques du compartiment golgien

Figure 20: Mode d'interaction du Chaperon BiP lors du repliement assisté des protéines.
D'après Palleros *et al.*, 1993, Wei *et al.*, 1995.



(Copeland, et al. 1986, Earl, et al. 1991, Gething, et al. 1986). Ainsi, en utilisant la méthode de fractionnement cellulaire, l'équipe d'Helenius a mis en évidence l'oligomérisation de l'hémagglutinine dans le RE et le compartiment intermédiaire (Tatu, et al. 1995). Un argument supplémentaire d'une telle localisation a été apporté par le fait que l'inhibition du transport antérograde RE-Golgi n'influe pas l'assemblage des protéines (Copeland, et al. 1986, Earl, et al. 1991).

4.2. Le rôle des chaperons

Dans les paragraphes précédents, nous avons discuté du rôle potentiel de certains chaperons dans l'assemblage des protéines. Il apparaît néanmoins qu'ils ne participent pas directement à l'oligomérisation des protéines. En effet, les chaperons assistent les protéines lors de leur repliement, et il a été montré qu'ils maintiennent ensuite ces protéines dans un état conformationnel compétent pour leur assemblage. Parmi de nombreux exemples, citons celui de la CNX qui joue un rôle primordial dans la rétention et la protection des sous-unités du CMHI et du TCR, préalablement à leur oligomérisation (Jackson, et al. 1994a, Rajagopalan, et al. 1994, Vassilakos, et al. 1996). Ce phénomène de rétention médié par les chaperons constitue l'une des fonctions principales du contrôle de qualité, dont nous discuterons dans le paragraphe **D.** (page 57).

4.3. La formation d'agrégats

In vivo, les agrégats représentent les produits issus d'un repliement non productif, dû à une défaillance qui peut apparaître à divers niveaux de la physiologie cellulaire (pour revue, (Thomas, et al. 1995).

Dans certaines conditions de stress, telle que l'hyperthermie, la déstabilisation des interactions moléculaires entraîne la formation d'agrégats. Cependant, la synthèse de protéines de choc thermique comme BiP permet de limiter temporairement l'agrégation (Doms, et al. 1987, Machamer, et al. 1990). A long terme, les agrégats non-covalents associés aux hsp seront soumis à la dégradation.

D'autre part, l'agrégation d'une protéine peut être la conséquence d'une mutation génétique et entraîner certaines pathologies cellulaires. En effet, une protéine mutée peut apparaître incapable de se replier ou peut présenter des défauts de repliement, conduisant à l'accumulation de formes non fonctionnelles dans la cellule. Par exemple, l'hypercholestérolémie de classe 2 se caractérise par des mutations au niveau du locus du récepteur LDL (low density lipoprotein), provoquant la synthèse de protéines immatures qui restent bloquées en amont de la voie de sécrétion (Hobbs, et al. 1990). Dans le cas de la maladie

d'Alzheimer, un défaut dans le repliement du peptide β de l'amyloïde est à l'origine de la formation de plaques de protéines agrégées dans et autour de la cellule (Soto and Frangione 1995).

Enfin, il s'avère que la formation d'agrégats n'est pas rare dans le cas des glycoprotéines d'enveloppe virales (Doms, et al. 1993). En effet, il a été montré que l'héماغlutinine du virus de la rougeole présente un repliement lent et inefficace, puisque moins de 50% des glycoprotéines acquièrent leurs glycanes mûres 5 heures après leur synthèse. La seconde moitié de ces protéines est en fait retenue dans le RE, sous forme mal repliée (Kohama, et al. 1985). Un exemple encore plus flagrant peut être donné par le VIH-1, pour lequel seulement 5 à 15% des glycoprotéines précurseurs gp160 sont clivées en glycoprotéines mûres gp120 (Willey, et al. 1988). Un large pourcentage des protéines gp160 restantes présentent des ponts disulfures intermoléculaires aberrants et demeurent dans le compartiment réticulaire (Owens and Compans 1990). Le VHC ne semble pas échapper à ce phénomène, comme nous le verrons dans le **chapitre III**. Ainsi, il a été observé, à de nombreuses reprises, la formations d'agrégats hétérogènes constitués par les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 mal repliées liées par des ponts disulfures (Dubuisson, et al. 1994, Duvet, et al. 1998, Grakoui, et al. 1994). Par conséquent, la tendance à l'agrégation, qui conduit inévitablement à une rétention plus importante des protéines virales, semble avoir une signification biologique pour la survie des virus. Ainsi, par le biais d'une limitation de la formation de leurs protéines natives, les virus pourraient limiter leur exposition précoce au système immunitaire de l'hôte.

D . La rétention des glycoprotéines dans le RE

Les glycoprotéines néosynthétisées dans le RE vont suivre la voie de sécrétion pour rejoindre leur compartiment final. Ce transport, qualifié d'antérograde, se fait par le bourgeonnement de vésicules qui seront successivement acheminées d'un compartiment à l'autre (pour revue, Rothman 1994). Cependant, de nombreuses protéines résidentes de chacun de ces compartiments doivent résister à cette sécrétion afin d'accomplir leur rôle fonctionnel. Parmi ces protéines, on citera entre autres les chaperons et foldases, les enzymes de la N-glycosylation, les protéines impliquées dans le stockage du calcium, ...

Deux types de mécanismes sont susceptibles de permettre une compartimentation des protéines:

- la rétention par recyclage, correspondant à un transport rétrograde continu de la protéine vers son compartiment d'origine.
- la rétention stricte, qui correspond à la « séquestration » temporaire ou durable de la protéine dans un compartiment.

1. La rétention des glycoprotéines par recyclage

Les signaux de recyclage réticulaires sont caractérisés par des motifs d'acides aminés qui seront reconnus par des récepteurs spécifiques, et qui permettront un retour au compartiment d'origine (pour revue, Nilsson and Warren 1994a).

a. Le motif KDEL

Le térapeptide carboxy-terminal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) existe chez un grand nombre de protéines du RE. Il est particulièrement retrouvé chez les chaperons grp94, BiP, CRT et PDI (Mazzarella, et al. 1990, Munro and Pelham 1987, Pelham 1989). Un motif équivalent KEEL a été mis en évidence chez la protéine Erp72 (Mazzarella, et al. 1990). La délétion de cette séquence conduit à la sécrétion des protéines tronquées, alors que son ajout carboxy-terminal sur une protéine sécrétée conduit à la rétention de cette dernière (Mazzarella, et al. 1990, Munro and Pelham 1987, Rajagopalan, et al. 1994).

Néanmoins, cette rétention ne semble pas être stricte puisque les protéines concernées présentent des modifications posttraductionnelles typiques du compartiment golgien (Rothman 1981). Par la suite, la découverte d'un récepteur spécifique de la séquence KDEL permit d'expliquer la présence des modifications posttraductionnelles précédentes (Lewis and Pelham 1992). La caractérisation biochimique de ce récepteur, codé par le gène ERD2, a montré qu'il s'agit d'une protéine très hydrophobe de 23 kDa, contenant sept domaines transmembranaires, et dont la localisation s'étend du RE jusqu'au *cis*-Golgi (Tang, et al. 1993). De plus, il apparaît que le récepteur erd2 interagit directement avec son substrat protéique d'une manière pH-dépendante (Lewis and Pelham 1992, Wilson, et al. 1993). En effet, l'acidification progressive du pH le long de la voie d'exocytose permet à erd2 de se fixer sur son ligand de façon optimale dans le *cis*-Golgi. Par la suite, le transport rétrograde du complexe erd2-protéine vers le RE, où le pH est plus élevé, conduit au relargage du substrat qui retrouve son compartiment d'origine.

b. Le motif dilysine

Un motif C-terminal cytosolique de type KK (Lys-Lys en position -3, -4 ou -5) a été mis en évidence par l'équipe de Peterson sur des protéines membranaires de type I (Jackson, et al. 1990). Un marquage lectinique spécifique des glycoprotéines chimériques CD4-E19K et CD8-E19K (le peptide E19K contenant le motif dilysine) a permis de montrer leur localisation réticulaire, malgré la présence de glycannes de type complexe, suggérant leur recyclage à partir du compartiment golgien (Jackson, et al. 1993). En outre, l'utilisation de mutants sec chez la levure a montré le rôle potentiel des coatomères dans la reconnaissance et le transport rétrograde

des protéines membranaires possédant ce motif dilysine (Cosson and Letourneur 1994). Il semble donc que les coatomères, ordinairement impliqués dans le transport vésiculaire basal, constituent de plus un récepteur potentiel pour la rétention par recyclage des protéines membranaires de type I.

Il est à noter qu'une séquence carboxy-terminale constituée d'acides aminés chargés (RKPRRE) a aussi été mise en évidence chez la CNX (Jackson, et al. 1990). La délétion de cet hexapeptide conduit à l'apparition de la CNX ainsi que des protéines qui lui sont associées au niveau de l'appareil de Golgi et de la surface cellulaire (Rajagopalan, et al. 1994). Ce résultat suggère que ce motif constitue un signal de rétention caractéristique du RE.

c. Le motif double-arginine

Chez les protéines membranaires de type II (C-terminal luminal), il existe un motif particulier di-arginine (RR) situé dans les cinq premiers acide aminés N-terminaux de la protéine (Schutze, et al. 1994). L'addition de ce motif sur des protéines « reporter » est nécessaire et suffisante pour leur localisation dans le RE. De plus, la composition des glycanes de ces protéines montre qu'elles sont temporairement passées par le compartiment golgien. Aucun récepteur spécifique de ce motif RR n'a encore été mis en évidence. Cependant, par analogie avec le motif KK, il a été suggéré que les protéines de type II seraient aussi « rétrotransportées » par l'intermédiaire des coatomères.

d. La rétention exercée par le contrôle de qualité

Comme nous l'avons précédemment cité, la plupart des chaperons possèdent un motif KDEL en position C-terminale. Par conséquent, l'association des protéines néosynthétisées avec les chaperons implique une localisation potentiellement réticulaire et *cis*-golgienne du complexe ainsi formé, à condition que ces protéines nouvellement synthétisées ne possèdent pas de signal de rétention strictement réticulaire. Ce type de rétention par interaction avec les chaperons correspond à l'un des rôles exercé par le contrôle de qualité, qui empêche une protéine immature de poursuivre sa progression à travers la voie de sécrétion (Kuznetsov, et al. 1997). L'exemple des travaux de Sitia et coll. montre l'implication d'une cystéine C-terminale sur la chaîne μ_s des IgM dans la rétention (réticulaire et *cis*-golgienne) ainsi que leur polymérisation en pentamères (Sitia, et al. 1990). Ces auteurs suggèrent en fait que cette rétention est médiée par l'interaction de μ_s avec une ou plusieurs "PDI-like proteins" (PDI, ERp72 ou ERp57), dont le rôle serait de former les ponts disulfures intermoléculaires entre les molécules d'IgM. De la même manière, des complexes BiP-protéine G du VSV ont pu être observés dans le RE et le *cis*-Golgi, renforçant l'hypothèse d'une rétention par recyclage

« indirecte » de certaines protéines via les chaperons moléculaires (Hammond and Helenius 1994b).

2. La rétention stricte des glycoprotéines

La rétention strictement réticulaire apparaît être un phénomène rare et ponctuel. En effet, les études menées pour la détermination de signaux de rétention spécifiques du RE concernent certains récepteurs cellulaires ainsi que des protéines virales. Dans ce dernier cas, les virions sont suspectés bourgeonner à partir de ce compartiment, comme nous le verrons dans l'exemple du VHC (voir **chapitre III**).

Le cas de la sous-unité H2a du récepteur des asialoglycoprotéines a été plus particulièrement décrit par l'équipe de Lederkremer (Shenkman, et al. 1997). La protéine H2a est une protéine membranaire normalement clivée dans sa partie luminale pour donner naissance à un fragment sécrété, qui fait partie du récepteur mûre. Les protéines H2a non clivées sont strictement retenues et dégradées dans le RE. Le pentapeptide EGHRG (Glu-Gly-His-Arg-Gly) a été montré comme étant responsable de la rétention de H2a dans le RE. Ainsi, le motif EGHRG ajouté à la sous-unité H1 du récepteur permet de la maintenir dans le RE. Des expériences supplémentaires de traitement à l'endoglucosidase H et à l' α -mannosidase ont montré que le mutant H1 présente des glycannes de type oligomannosidiques. Enfin, des études d'immunolocalisation en présence de nocodazole (un inhibiteur du transport rétrograde compartiment intermédiaire-RE) ont mis en évidence une répartition exclusivement réticulaire de cette protéine. Par conséquent, même si le mécanisme de rétention mis en jeu par ce pentapeptide reste encore à élucider, il semble que la nature des acides aminés qui le composent soit déterminante.

E. La dégradation des protéines mal repliées

La plupart des protéines qui n'atteignent pas leur conformation native sont dégradées suivant un mécanisme sélectif et spécifique qui fait partie intégrante du contrôle de qualité. Ce mécanisme qui concerne les protéines localisées dans la lumière du RE est connu sous le nom de ERAD (ER-associated degradation) (Werner, et al. 1996).

- La dégradation est cytosolique

De nombreuses études suggèrent que cette dégradation a lieu dans le cytosol, sous la dépendance d'un large complexe protéolytique, le protéasome. De plus, il apparaît que le

mécanisme ERAD touche aussi bien les protéines solubles que membranaires (Hiller, et al. 1996, Werner, et al. 1996, Wiertz, et al. 1996).

- L'exportation de la protéine à dégrader vers le cytosol

Le mécanisme d'exportation des protéines du RE vers le cytosol est inconnu. Néanmoins, les travaux de plusieurs équipes ont permis d'éclaircir certains points. Wiertz et coll. ont récemment démontré que la chaîne lourde du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), destinée à être dégradée, était transitoirement associée à Sec61 β , dans des cellules de mammifères infectées par le cytomégalo virus (Wiertz, et al. 1996). Une deuxième étude, portant sur l'utilisation de mutants sec61 chez la levure, confirma le rôle potentiel du complexe trimérique Sec61 dans l'exportation des protéines lumenales vers le cytosol, encore appelé rétro-transport (Pilon, et al. 1997).

Il apparaît donc que Sec61 soit à l'origine à la fois de l'importation des protéines en voie de synthèse dans le RE mais aussi de leur exportation vers le cytosol en vue de leur dégradation.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans ce mémoire, les chaperons du RE sont capables de reconnaître une protéine incomplètement repliée d'une protéine native. Par conséquent, elles constituent d'excellents candidats quant à l'adressage des protéines mal repliées vers le système ERAD. En effet, certaines protéines mutantes, vouées à être dégradées, ont été observées en association avec la CNX, préalablement à leur dégradation (Liu, et al. 1997, Qu, et al. 1996). En outre, Chen et coll. ont montré que l'inhibition partielle de l'interaction de la CNX avec l'apolipoprotéine B, atténue significativement la dégradation de cette dernière (Chen, et al. 1998). Très récemment, Brodsky et coll. ont décrit que des mutants du gène kar2 de levure (codant la protéine BiP), compétents pour la ségrégation, étaient défectifs pour la dégradation du pro- α facteur par le système ERAD (Brodsky, et al. 1999). Ainsi, BiP exercerait trois fonctions distinctes chez la levure: la ségrégation posttraductionnelle des protéines dans le RE, leur repliement luminal, et enfin leur adressage éventuel vers le complexe Sec61 pour leur dégradation ultérieure dans le cytosol. Dans les cellules de mammifères, l'implication directe de BiP et de CNX dans la dégradation des protéines associées au RE reste encore à démontrer.

- Le protéasome, acteur de la dégradation des protéines

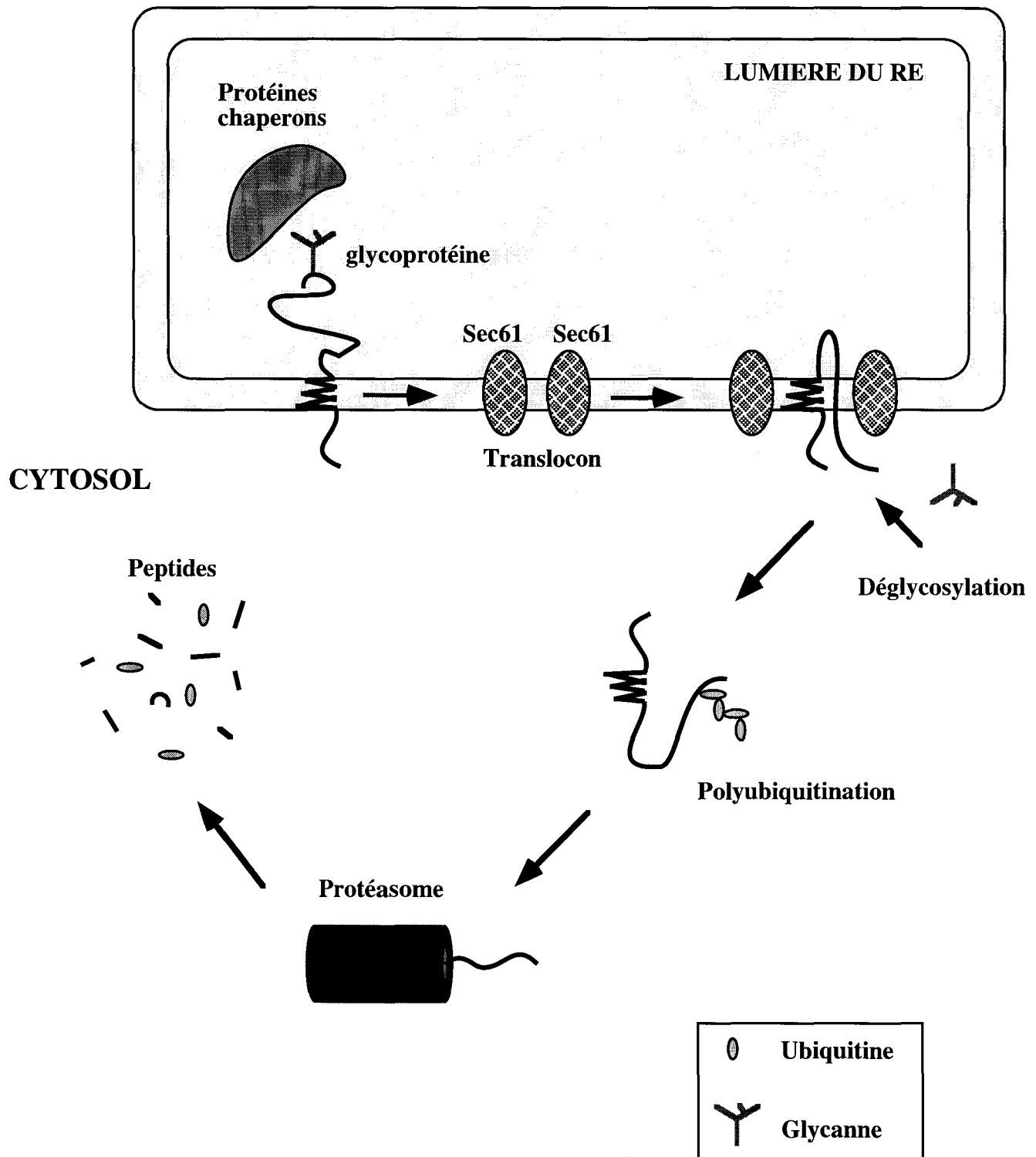
L'utilisation de l'ALLN (N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal) et de la lactacystine en tant qu'inhibiteurs (respectivement réversible et irréversible) du protéasome, a permis de mettre en évidence l'implication de ce complexe protéasique dans le système ERAD. Ainsi, l'équipe de Cresswell a montré une accumulation des chaînes lourdes du CMH I dans le cytosol de cellules

défectives en $\beta 2$ microglobuline ou en TAP (transporters associated with antigen processing) traitées par ces inhibiteurs (Hughes, et al. 1997). De plus, ces auteurs ont mis en évidence que ces chaînes lourdes étaient déglycosylées, suggérant la participation possible d'une N-glycanase cytosolique, dont un représentant a récemment été décrit chez la levure (Suzuki, et al. 1998).

Cependant, les travaux de Hiller et coll. ne font pas mention d'une déglycosylation préalable de la carboxypeptidase Y de levure avant sa dégradation, mais plutôt d'une ubiquitination (Hiller, et al. 1996). En effet, l'ubiquitination consiste en la fixation d'une molécule d'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible (Scheffner, et al. 1995). Les protéines destinées à être dégradées sont le plus souvent polyubiquitinées, une molécule d'ubiquitine étant capable de se polymériser en se liant sur la lysine 48 d'une ubiquitine adjacente. Ainsi, la polyubiquitination constitue un signal de protéolyse des protéines qui ne semble pourtant pas être indispensable à la dégradation protéosomale (Werner, et al. 1996, Wiertz, et al. 1996).

Enfin, il est à noter que l'inhibition du protéasomes par les drogues mentionnées ci-dessus induit la synthèse des ARN messagers des chaperons, notamment de BiP, grp94 et Erp72 (Bush, et al. 1997). Ces résultats montrent bien que ces protéines luminales semblent impliquées, même indirectement, dans le système de dégradation du contrôle de qualité. La figure 21 illustre le processus général de dégradation cytosolique des glycoprotéines mal conformées (d'après Bonifacino 1996).

Figure 21: Processus général de la dégradation cytosolique des glycoprotéines mal conformées (d'après Bonifacino, 1996).



RESULTATS DISCUSSION

Chapitre III: Le repliement et l'assemblage des glycoprotéines du VHC au sein du RE

A. Les glycoprotéines du VHC

Le clivage de la polyprotéine du VHC s'effectue par une (ou des) peptidase(s) signal d'origine cellulaire (C/E1, E1/E2, E2/p7, p7/NS2), ainsi que par les protéases NS2 (NS2/NS3) et NS3 (NS3/4A, 4A/4B, 4B/5A, 5A/5B) (Figure 7). Les clivages cotraductionnels au niveau des sites C/E1, E1/E2 et NS2/NS3 donnent naissance aux produits E1 et à un précurseur de E2, E2-NS2. Ce précurseur est ensuite clivé de façon posttraductionnelle pour donner naissance aux produits E2, E2-p7 et NS2 (Grakoui, et al. 1993a, Lin, et al. 1994a, Mizushima, et al. 1994a, Selby, et al. 1994). Pour certaines souches du VHC comme la souche H, le clivage au niveau du site E2/p7 est inefficace, ce qui conduit à l'apparition d'une espèce relativement stable E2-p7 (Dubuisson, et al. 1994, Lin, et al. 1994a, Mizushima, et al. 1994a, Selby, et al. 1994). Par contre, pour la souche BK, le clivage E2/p7 par la signalase est plus efficace et peu de formes E2-p7 peuvent être mises en évidence après immunoprécipitation (Dubuisson, et al. 1994).

B. La synthèse des glycoprotéines du VHC

1. La ségrégation des glycoprotéines du VHC

La synthèse de la polyprotéine est cytosolique et la ségrégation des glycoprotéines E1 et E2 s'effectue ensuite à travers la membrane réticulaire. En effet, des expériences de transcription-traduction *in vitro* montrent que les séquences signal en amont de chacune des glycoprotéines E1 et E2 permettent de diriger la polyprotéine vers le réticulum endoplasmique (Figure 6, Hijikata, et al. 1991b). La ségrégation des glycoprotéines vers le lumen ainsi que le clivage C-terminal de leur peptide signal par une signalase cellulaire peut alors avoir lieu. Il est à noter que les peptides signaux de E1 et E2 sont respectivement situés sur la protéine C (aa 174 à 191 de la polyprotéine) et la protéine E1 (aa 371 à 383 de la polyprotéine, figure 6).

Par analogie avec les protéines cellulaires qui empruntent la voie de sécrétion, la reconnaissance de chacun des peptides signaux des glycoprotéines E1 et E2 par une particule SRP ("signal recognition particule") avant leur acheminement à travers la machinerie du translocon semble possible mais n'a pas encore été analysée à ce jour.

2. Les glycoprotéines du VHC sont membranaires

Afin de prouver que E1 et E2 sont bien des glycoprotéines membranaires, Ralston et coll. montrèrent qu'elles pouvaient être dissociées de la membrane réticulaire grâce au détergent, alors qu'une augmentation de concentration en sels n'avait aucun effet (Ralston, et al. 1993). Des expériences de digestion trypsique menées par l'équipe de Ou ont permis de mettre en évidence que la protéine E1 transloquée était localisée dans la membrane réticulaire et/ou le lumen, prouvant ainsi son insertion membranaire (Lo, et al. 1996). Ainsi, les glycoprotéines du VHC sont supposées être des protéines membranaires de type I, avec un ectodomaine N-terminal et une séquence d'ancrage hydrophobe C-terminale.

Un argument supplémentaire de cette localisation transmembranaire des glycoprotéines du VHC peut être apporté par l'étude de formes tronquées. Pour la glycoprotéine E2, des délétions C-terminales de la région hydrophobe résultent en la sécrétion de l'ectodomaine (Michalak, et al. 1997). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse suggérant que le domaine d'ancrage de E2 débute à l'acide aminé 718 (position sur la polyprotéine) (Mizushima, et al. 1994a). La situation apparaît plus confuse pour E1. En effet, une forme tronquée de cette protéine se terminant au résidu 340 n'est sécrétée que si une délétion interne entre les acides aminés 262 et 290 est introduite, suggérant l'existence d'un second domaine d'ancrage membranaire (Matsuura, et al. 1994). Cependant, deux équipes dont la nôtre, ont montré que des formes tronquées se terminant aux acides aminés 311 et 334 étaient sécrétées en l'absence de cette délétion interne (Hussy, et al. 1996, Michalak, et al. 1997). Plus récemment, il a été prédit que le domaine transmembranaire de E1 débutait à l'acide aminé 353 et comprenait tous les résidus situés en aval de celui-ci (Cocquerel, et al. 1999).

3. Les glycoprotéines E1 et E2 sont N-glycosylées

Les mobilités électrophorétiques de E1 et E2 sur gel de SDS-polyacrylamide correspondent à des masses moléculaires respectives de 31 et 70 kDa. Néanmoins, ces chiffres sont supérieurs à ceux prédits à partir de leur séquence primaire en acides aminés. En fait, le retard de migration de ces protéines a été attribué à leur N-glycosylation (Grakoui, et al. 1993a, Hijikata, et al. 1991b, Hsu, et al. 1993, Kohara, et al. 1992, Matsuura, et al. 1994). De plus, des expériences d'affinité lectinique effectuées sur des séra de patients infectés suggèrent que des glycannes de type N-liés existeraient à la surface des virions circulants probablement au niveau des protéines d'enveloppe E1 et/ou E2 (Sato, et al. 1993).

a. Les sites potentiels de N-glycosylation des glycoprotéines E1 et E2

Sur base des séquences en acide aminés, il s'avère que les glycoprotéines E1 et E2 possèdent respectivement 5 ou 6 et 11 sites potentiels de N-glycosylation (Miyamura and Matsuura 1993). Cependant, des études menées dans notre laboratoire par J.C. Meunier sur la glycoprotéine E1 montrent que ces sites ne sont pas tous glycosylés.

Une étude récente a révélé que sur les 5 sites potentiels de glycosylation présents sur la glycoprotéine E1 (génotype 1a), 4 sont effectivement glycosylés (Fournillier-Jacob, et al. 1996a). Par des travaux plus approfondis, et notamment par une approche utilisant la mutagenèse dirigée, J.C. Meunier a identifié le site n°5, comme étant le site non-glycosylé (Meunier, et al. 1999). La raison de ce défaut de glycosylation s'explique en fait par une composition en acides aminés défavorable du sequon (Asn-X-Ser-Y, où X=Trp et Y=Pro) qui serait à l'origine d'une conformation inappropriée du site ou d'un blocage de l'accessibilité de l'enzyme de transfert ou du donneur de glycanne (Shakin-Eshleman, et al. 1996). Ces mêmes travaux ont révélé que la mutation (Asn → Gln) du site de glycosylation n°4 de E1 provoquait une diminution significative de la formation des complexes E1E2 non-covalents, considérés comme natifs (décrits dans le paragraphe C., page 66), suggérant l'importance de ce glycanne pour la mise en conformation de E1, et donc pour son assemblage avec E2. Là encore, la composition en acides aminés du sequon a montré la présence d'une cystéine (Asn-X-Ser, où X=Cys), qui est susceptible de s'engager dans une liaison pont disulfure, en absence de glycosylation. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la glycoprotéine E1 exprimée à partir du mutant du site n°4 a tendance à former des agrégats liés par des ponts disulfures.

b. Les N-glycannes des glycoprotéines du VHC sont de type oligomannosidiques

L'utilisation de l'endo- β -glucosaminidase H (endo H), qui déglycosyle les N-glycannes de type oligomannosidiques et quelques glycannes de type hybride (Robbins, et al. 1984), a permis de montrer que les glycannes des glycoprotéines du VHC ne sont pas de type complexe (Dubuisson, et al. 1994). En effet, lors d'expériences de marquage-chasse des glycoprotéines E1 et E2, aucune forme endo H résistante n'a pu être mise en évidence, suggérant que ces protéines n'ont pas été en contact avec les enzymes de la maturation des glycannes situées au delà du *cis*-Golgi.

Récemment, le traitement des complexes non-covalents E1E2 à la peptide N-glycanase F (PNGase F qui enlève la totalité du N-glycanne), suivi d'une analyse des glycannes par HPLC a révélé qu'ils étaient uniquement constitués d'oligomannosides (Duvet, et al. 1998). Cette dernière expérience apporte la preuve que les glycoprotéines E1 et E2 ayant atteint leur conformation native n'ont pas franchi le compartiment golgien. Comme nous venons de le voir, la compartimentation des glycoprotéines du VHC est étroitement liée à leur glycosylation qui

constitue un témoin de leur localisation. Nous décrirons plus en détails les différents mécanismes mis en jeu dans la rétention réticulaire des glycoprotéines du VHC dans le paragraphe D. (page 68).

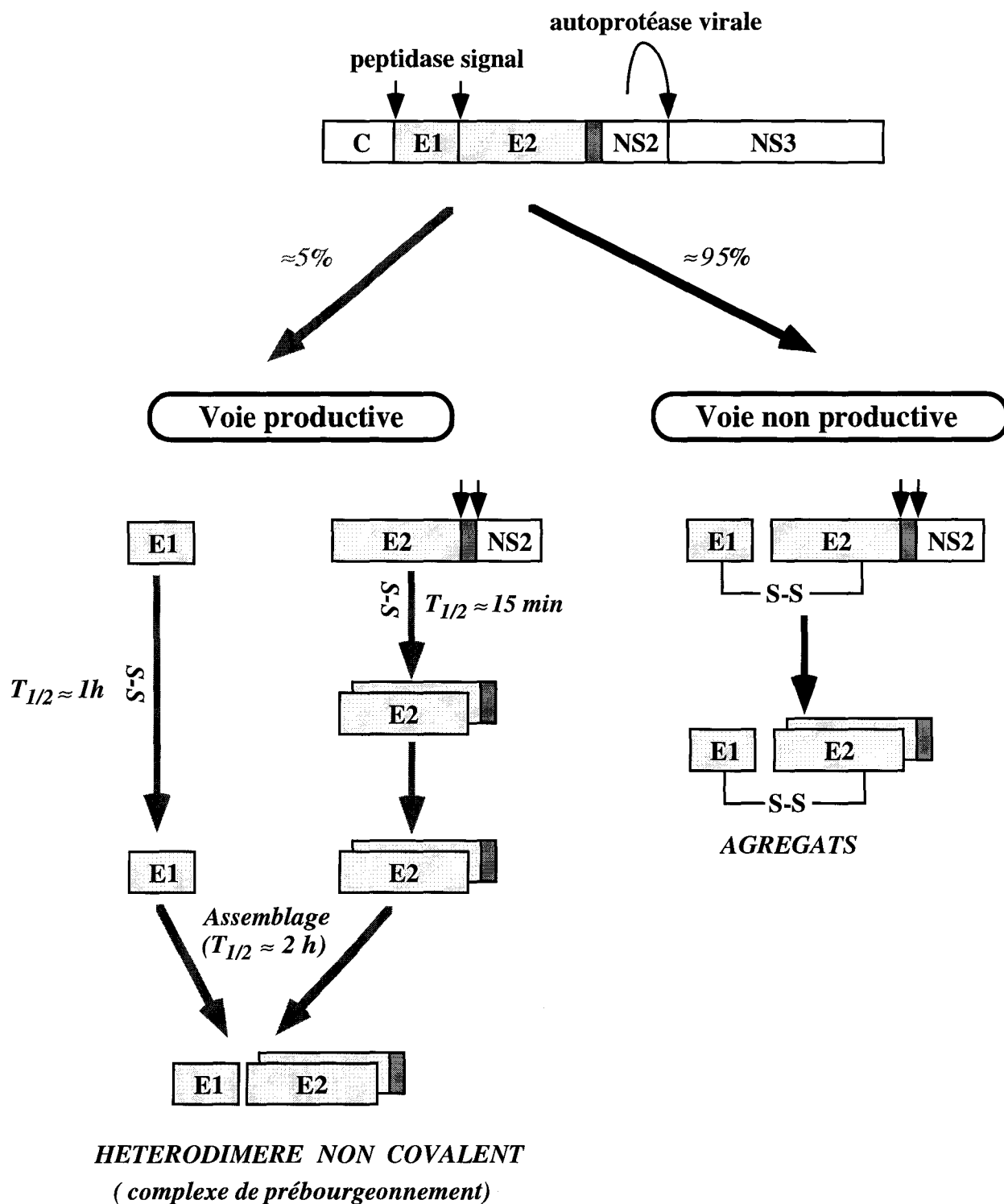
C. L'assemblage des glycoprotéines du VHC

Des études utilisant des systèmes d'expression transitoire viraux ou non-viraux ont montré que les glycoprotéines du VHC interagissent entre elles pour former des complexes qui sont probablement des sous-unités fonctionnelles de la particule du VHC (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994, Grakoui, et al. 1993a, Lanford, et al. 1993, Ralston, et al. 1993). Cependant, en l'absence d'un système de culture cellulaire permettant l'amplification du VHC, les complexes glycoprotéiques présents à la surface de la particule virale n'ont pas encore été caractérisés. Notre équipe s'est intéressée à étudier la formation de ces différents complexes dans des cellules infectées par des virus recombinants exprimant la polyprotéine du VHC. Ces travaux ont permis de montrer qu'en présence de détergents non-ioniques, deux types de complexes sont formés: un hétérodimère de E1 et E2 stabilisé par des interactions non-covalentes et des agrégats hétérogènes contenant des ponts disulfures intermoléculaires (Dubuisson, et al. 1994, Dubuisson and Rice 1996). Des travaux plus récents ont également mis en évidence que les hétérodimères non-covalents sont composés de protéines bien repliées alors que les agrégats sont formés de protéines mal repliées (Deleersnyder, et al. 1997). La distinction entre ces deux types de complexes a conduit notre équipe à modéliser l'assemblage des glycoprotéines du VHC selon deux voies: une voie productive de formation des complexes non-covalents, et une voie non productive qui correspond à la formation d'agrégats liés par des ponts disulfures (Figure 22).

1. La formation de complexes E1E2 natifs

En l'absence de réactifs immuns appropriés, il est difficile de distinguer les glycoprotéines qui suivent la voie productive de repliement et d'assemblage de celles qui suivent la voie non productive conduisant au mauvais repliement et à l'agrégation. Afin de pouvoir faire cette distinction, un anticorps monoclonal dépendant de la conformation (H2) qui permet de précipiter uniquement l'hétérodimère E1E2 non covalent a été produit dans le laboratoire (Deleersnyder, et al. 1997). Il a été montré que cet anticorps reconnaît effectivement un complexe non-covalent dont la cinétique d'assemblage est lente ($T_{1/2} \approx 2h$). Sa résistance aux protéases ainsi que son absence d'interaction avec le chaperon CNX (voir paragraphe E.3., page 71) suggèrent que l'anticorps H2 reconnaît le complexe glycoprotéique de « prébourgeonnement ».

Figure 22: Les deux voies de repliement et d'assemblage des glycoprotéines du VHC en complexes, (Dubuisson *et al.*, 1994, Dubuisson et Rice, 1996, Deelersnyder *et al.*, 1997).



Contrairement à la souche BK du VHC chez laquelle le clivage E2/p7 est efficace, une partie des complexes non-covalents formés chez la souche H contient la glycoprotéine E2 sous sa forme E2-p7 (Dubuisson, et al. 1994). Une inefficacité similaire dans le clivage de E2/p7 est retrouvée chez les pestivirus, mais la forme E2-p7 n'est pas détectée à la surface des virions matures (Elbers, et al. 1996, Lin, et al. 1994a). Néanmoins, même si les hétérodimères E1E2p7 du VHC correctement repliés sont reconnus par l'anticorps H2, rien ne prouve encore que ces complexes soient présents à surface des particules virales néoformées (Deleersnyder, et al. 1997).

En plus d'une interaction des glycoprotéines du VHC entre elles, il a été montré qu'elles peuvent interagir avec d'autres protéines du VHC. En effet, grâce à des expériences d'immunoprécipitation, une interaction des protéines de capsid et NS2 avec les glycoprotéines E1 et E2 ont été mises en évidence (Lo, et al. 1996, Selby, et al. 1994). Dans notre laboratoire, il a aussi été observé une coprécipitation de ces mêmes protéines (C et NS2) avec E1 et E2, cependant ces protéines n'interagissent pas avec la forme native du complexe E1E2 (Dubuisson, 1999, sous presse).

2. Les séquences impliquées dans l'association des glycoprotéines E1 et E2 en hétérodimères

Lorsque des formes tronquées de E1 et E2 dépourvues de leurs domaines transmembranaires sont coexprimées, elles interagissent entre elles pour former des complexes sécrétés dans le surnageant des cellules infectées (Hussy, et al. 1996, Matsuura, et al. 1994, Michalak, et al. 1997). Ces résultats suggèrent que les séquences importantes pour l'interaction des glycoprotéines du VHC en hétérodimères se situent dans leur ectodomaine. Un argument supplémentaire de cette interaction médiée par les ectodomains a été donné par Yi et coll. qui ont identifié ces séquences par far-Western blotting et pull-down (Yi, et al. 1997a). En effet, ces auteurs ont montré que des séquences N-terminales des glycoprotéines E1 et E2 sont à l'origine de leur association. Cependant, ces résultats ont été observés dans le contexte de formes tronquées de ces glycoprotéines virales, dont l'état de repliement n'a pas été caractérisé. Or, comme nous l'avons déjà mentionné, les glycoprotéines du VHC ont tendance à former des agrégats (Dubuisson, et al. 1994), il est donc possible que les séquences identifiées par Yi et coll. soient des domaines d'interactions non productives conduisant à la formation d'agrégats. Des études plus récentes dans notre laboratoire nous ont permis d'éclaircir ce point. Ainsi, notre équipe a montré à l'aide d'anticorps spécifiques que des formes tronquées de E1 et E2, dépourvues de leurs domaines transmembranaires, interagissent entre elles pour former des agrégats et non des complexes natifs (Michalak, et al. 1997).

Il a également été montré que des délétions C-terminales de la glycoprotéine E2 ou le remplacement de son domaine transmembranaire par celui d'une autre protéine conduisent à

l'absence de la formation de complexes E1E2 (Cocquerel, et al. 1998, Michalak, et al. 1997). Ces résultats semblent indiquer que les domaines transmembranaires des glycoprotéines du VHC interagissent entre eux pour stabiliser les complexes E1E2. Ces résultats n'excluent cependant pas la présence d'interactions au niveau des ectodomaines des protéines mûres.

Récemment, L. Cocquerel a montré que la mutation de résidus chargés, présents au niveau des domaines transmembranaires de E1 et de E2 conduisait à la quasi-disparition de la formation des complexes natifs (Cocquerel, et al. soumis pour publication). Ces résultats sont en faveur d'une implication des domaines transmembranaires des glycoprotéines du VHC dans l'oligomérisation du complexe E1E2.

3. La formation d'agrégats

Comme nous l'avons déjà mentionné, il apparaît que la formation des complexes E1E2 est lente. Cette lenteur dans l'assemblage des glycoprotéines du VHC peut être attribuée à une inefficacité de repliement, étant donné que la majorité des protéines synthétisées forment des agrégats (Deleersnyder, et al. 1997). Ceci ne semble pas être dû à des mutations introduites durant la synthèse de l'ADN complémentaire ou à des amplifications par PCR du clone d'origine utilisé dans nos expériences. En effet, des résultats similaires ont été observés avec un virus recombinant de la vaccine qui exprime les protéines de structure d'un clone infectieux récemment caractérisé (Kolykhalov, et al. 1997, Dubuisson et Rice, résultats non publiés). Cette tendance à l'agrégation pourrait également être due au haut niveau d'expression des protéines par les vecteurs hétérologues utilisés, ou encore à des effets indésirables du vecteur sur la physiologie de la cellule. Cependant, l'utilisation d'un système d'expression non viral (cellules UHCV-11.4., Moradpour, et al. 1998) qui permet d'atteindre des taux d'expression plus faibles a aussi montré que l'agrégation était toujours présente (Dubuisson et Moradpour, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que cette propension à former des agrégats pourrait être une propriété intrinsèque des glycoprotéines du VHC, comme nous le verrons dans le paragraphe E.4. (page 79, Dubuisson, 1999, sous presse).

D. La localisation subcellulaire des protéines du VHC

Dans nos systèmes d'expression utilisés pour synthétiser les protéines du VHC, le complexe glycoprotéique natif E1E2 est retenu dans le RE (Deleersnyder, et al. 1997). Cette rétention est sans doute nécessaire pour l'étape de bourgeonnement viral. En effet, chez les flavivirus, les virions enveloppés apparaissent dans des vésicules intracellulaires, probablement des modifications du RE, et sont relarguées de la cellule infectée en suivant la voie d'exocytose (Griffiths and Rottier 1992, Pettersson 1991).

Les hétérodimères mûres du VHC n'interagissent pas avec le chaperon CNX (Deleersnyder, et al. 1997), ce qui suggère qu'ils sont retenus dans le RE, non pas par l'intervention du contrôle de qualité, mais plutôt par un ou plusieurs signaux de rétention spécifiques. En outre, par la construction de protéines chimériques entre les glycoprotéines du VHC et une protéine normalement exportée à la surface cellulaire (CD4 ou CD8), il a été montré que les domaines transmembranaires de E1 et de E2 sont impliqués dans la rétention stricte au niveau du RE (Cocquerel, et al. 1999, Cocquerel, et al. 1998, Duvet, et al. 1998). En effet, il s'est avéré que les chimères des protéines CD4 et CD8 possédant les domaines transmembranaires de E1 ou de E2 demeurent dans le compartiment réticulaire.

Plus récemment dans notre laboratoire, L. Cocquerel a muté les acides aminés chargés présents au milieu des domaines transmembranaires des glycoprotéines E1 et E2 (Cocquerel, et al., soumis pour publication). Le remplacement de ces résidus par une alanine a conduit à l'exportation en surface des chimères CD4-E1 et CD4-E2 normalement retenues dans le RE. Ces résultats mettent en évidence l'importance de ces résidus chargés pour la rétention au niveau du RE. Il faut cependant noter que d'autres fonctions des domaines transmembranaires de E1 et de E2 étaient également perturbées par ces mutations. En effet, celles-ci provoquaient une perturbation de l'assemblage du complexe E1E2 et altéraient la fonction séquence signal présente dans la moitié C-terminale de ces domaines. Ces données suggèrent que ces résidus chargés sont probablement importants pour la structure de ces domaines.

E. Le repliement des glycoprotéines du VHC

L'efficacité de repliement des protéines dépend de leur répartition entre la voie productive conduisant à l'apparition de molécules natives et la voie non productive, qui conduit au mauvais repliement et à l'agrégation (Nilsson and Anderson 1991a).

Dans le cas du VHC, notre équipe a pu montrer que les glycoprotéines E1 et E2 correctement repliées interagissent pour former un hétérodimère stabilisé par des interactions non-covalentes (Deleersnyder, et al. 1997, Dubuisson, et al. 1994). Cependant, la formation de ces complexes caractéristiques de la voie productive est lente ($T_{1/2} \approx 2h$) et inefficace (environ 5% des complexes E1E2 sont concernés). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à identifier les étapes qui pourraient être limitantes dans la formation de ces complexes natifs.

1. La formation des ponts disulfures intramoléculaires

Le RE est le siège d'un potentiel oxydo-réducteur suffisamment oxydant pour assurer la formation des ponts disulfures des protéines en voie de repliement. C'est dans ces conditions que les foldases telles que PDI peuvent jouer leur rôle de catalyseur de formation et

d'isomérisation des ponts disulfures, afin d'aider les protéines dans leur repliement. Comme la plupart des protéines cellulaires, les glycoprotéines E1 et E2 du VHC possèdent des résidus de cystéines (respectivement 8 et 20 résidus, Daemer, et al. résultats non publiés). En conditions non réductrices, et après migration en SDS-PAGE, la formation des ponts disulfures intramoléculaires se caractérise par une augmentation de la mobilité des protéines, dont la conformation est alors plus compacte (Doms, et al. 1993). Ainsi, J. Dubuisson a montré que la formation des ponts disulfures de la glycoprotéine E1 est très lente ($T_{1/2} > 1h$) alors qu'elle apparaît complète pour E2, suite au clivage E2/NS2 ($T_{1/2} \approx 15$ min) (Dubuisson and Rice 1996). Ces résultats suggèrent que le repliement « disulfide-dépendant » de E1 est limitant pour la formation des hétérodimères non-covalents. Cependant, des expériences de cinétique de repliement de la glycoprotéine E2 à l'aide de l'anticorps H2 (conformation-dépendant anti-E2) indiquent que sa forme native apparaît tardivement ($T_{1/2} \approx 2h$) (Deleersnyder, et al. 1997). Par conséquent, le repliement de E2 semble aussi être lent, mais cette fois-ci la cause de cette lenteur serait due à une étape limitante ultérieure à la formation des ponts disulfures intramoléculaires. Récemment, des anticorps monoclonaux humains dirigés contre la glycoprotéine E2 ont permis de montrer que des épitopes dépendants de la conformation peuvent se former plus précocement que celui qui est reconnu par notre anticorps H2 (Habersetzer, et al. 1998). Ces résultats suggèrent que des sous-domaines peuvent se former rapidement, et en corrélation avec l'acquisition des ponts disulfures intramoléculaires. En outre, la reconnaissance d'agrégats par ces anticorps indique qu'un certain état de repliement existe au sein des complexes glycoprotéiques de la voie d'assemblage non-productive.

2. Le repliement de E1 est dépendant de la coexpression de E2

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés au repliement des glycoprotéines du VHC exprimées seules. Ainsi, nous avons comparé la cinétique de repliement des glycoprotéines E1 et E2 exprimées seules ou coexprimées. Nous avons pu montrer qu'en l'absence de la glycoprotéine E2, la glycoprotéine E1 était incapable d'atteindre sa forme oxydée, qui correspond à une forme de repliement proche de l'état natif (Michalak, et al. 1997). Inversement, le repliement de E2 n'était en aucun cas influencé par l'absence de la glycoprotéine E1, comme l'ont montré les résultats des immunoprécipitations par l'anticorps H2, dépendant de la conformation.

Ces résultats suggèrent que l'association rapide de la glycoprotéine E2 (ou de son précurseur E2-NS2) avec la glycoprotéine E1 protège cette dernière des interactions non-productives susceptibles de la conduire vers la voie de formation des agrégats. Par conséquent, la glycoprotéine E2 semble exercer un rôle de chaperon nécessaire au repliement correct de E1. Un rôle similaire avait déjà été montré chez le virus de l'encéphalite japonaise (Konishi and Mason 1993). En effet, les auteurs avaient observé qu'une cosynthèse de la protéine prM était

requis au bon repliement, à l'association membranaire et à l'assemblage de la protéine d'enveloppe virale E.

3. Le rôle des chaperons dans le repliement des glycoprotéines E1 et E2 du VHC

Outre les enzymes de repliement ou foldases que nous avons mentionnées, le RE contient des chaperons moléculaires tels que BiP, grp94, CNX (calnexine) et CRT (calréticuline). Leur rôle dans le repliement des glycoprotéines a largement été étudié (voir **chapitre II**), et ces chaperons font partie du contrôle de qualité des protéines qui transitent dans le RE.

Il est maintenant clairement établi que le chaperon CNX s'associe spécifiquement et de façon prolongée avec les glycoprotéines incomplètement repliées ou non-assemblées. Des travaux menés dans notre laboratoire ont mis en évidence l'interaction de ce chaperon avec les glycoprotéines du VHC (Dubuisson and Rice 1996). Ainsi, l'association rapide de la CNX avec les glycoprotéines E1 et E2 (ou E2-NS2) semble suivie d'une dissociation lente. De plus, la CNX interagit avec les formes oxydées de ces glycoprotéines, suggérant qu'une étape supplémentaire dans le repliement ou l'assemblage de ces protéines est nécessaire pour leur dissociation de ce chaperon. Il est à noter que l'oxydation de tous les ponts disulfures d'une protéine ne veut pas forcément dire qu'elle a atteint sa forme native.

Bien que chacune des glycoprotéines du VHC semble interagir indépendamment avec la CNX, cette dernière a aussi pu être coprécipitée avec des complexes E1E2 (Dubuisson et Rice, 1996). Néanmoins, les glycoprotéines du VHC reconnues par l'anticorps H2 (qui dépend de la conformation) ne présentent pas d'interaction avec la CNX, suggérant que les glycoprotéines du VHC se dissocient de ce chaperon lorsqu'elles ont atteint leur conformation native (Deleersnyder, et al. 1997).

Ces résultats préliminaires nous ont conduit à approfondir la caractérisation de l'interaction de la CNX ainsi que d'autres chaperons du RE avec les glycoprotéines E1 et E2, et ainsi d'analyser l'incidence de ces chaperons sur l'efficacité de repliement et d'assemblage de ces glycoprotéines virales. Ces travaux ont fait l'objet d'un article paru dans *Journal of Virology*, sous le titre « **Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins** », vol. 72, N°5, p. 3851-3858, (1998).

ARTICLE I

**"Involvement of Endoplasmic Reticulum chaperone in
the folding of Hepatitis C virus glycoproteins"**

Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins

AMÉLIE CHOUKHI, SOPHANA UNG, 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 17 October 1997/Accepted 22 January 1998

The hepatitis C virus (HCV) genome encodes two envelope glycoproteins (E1 and E2) which interact noncovalently to form a heterodimer (E1-E2). During the folding and assembly of HCV glycoproteins, a large portion of these proteins are trapped in aggregates, reducing the efficiency of native E1-E2 complex assembly. To better understand this phenomenon and to try to increase the efficiency of HCV glycoprotein folding, endoplasmic reticulum chaperones potentially interacting with these proteins were studied. Calnexin, calreticulin, and BiP were shown to interact with E1 and E2, whereas no interaction was detected between GRP94 and HCV glycoproteins. The association of HCV glycoproteins with calnexin and calreticulin was faster than with BiP, and the kinetics of interaction with calnexin and calreticulin were very similar. However, calreticulin and BiP interacted preferentially with aggregates whereas calnexin preferentially associated with monomeric forms of HCV glycoproteins or noncovalent complexes. Tunicamycin treatment inhibited the binding of HCV glycoproteins to calnexin and calreticulin, indicating the importance of N-linked oligosaccharides for these interactions. The effect of the co-overexpression of each chaperone on the folding of HCV glycoproteins was also analyzed. However, the levels of native E1-E2 complexes were not increased. Together, our data suggest that calnexin plays a role in the productive folding of HCV glycoproteins whereas calreticulin and BiP are probably involved in a nonproductive pathway of folding.

Hepatitis C virus (HCV) is a positive-strand RNA virus which belongs to the *Flaviviridae* family (16). 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 (39). Cleavages of this polyprotein are co- and posttranslational and generate at least 10 polypeptides including 2 glycoproteins, E1 and E2 (54). Since the molecular cloning of HCV (4), characterization of its genomic organization and expression has progressed rapidly. However, despite this progress, data on the HCV life cycle remain scarce. This is due to the poor replication of HCV in cell culture.

HCV glycoproteins E1 and E2 interact to form complexes (10, 20, 34, 53). Characterization of HCV glycoprotein complex formation indicates that a majority of these proteins are misfolded aggregates (6, 10). Since analysis of HCV glycoprotein assembly in viral (10) and nonviral (11) expression systems showed similar results, this tendency toward aggregation does not seem to be due to abnormally high-level production driven by the viral expression systems used. This suggests that their tendency toward aggregation could be an intrinsic property of HCV glycoproteins. Recently, we produced a monoclonal antibody (MAb) which recognizes properly folded E2 and precipitates native HCV glycoprotein complexes but not misfolded aggregates (6). We have shown that properly folded E1 and E2 interact to form a heterodimer stabilized by noncovalent interactions. Formation of stable E1-E2 complexes is slow ($t_{1/2} \approx 2$ h) because of the slow folding of these proteins. Indeed, formation of intramolecular disulfide bonds is slow for E1 ($t_{1/2} > 1$ h) (12), and unidentified events following the acquisition of intramolecular disulfide bonds limit the folding of E2 (6, 12, 21, 42). 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 (42).

The lack of an efficient system for cell culture replication has so far hampered our understanding of HCV particle assembly. However, the absence of complex glycans, the localization of expressed HCV glycoproteins in the endoplasmic reticulum (ER) (10, 53), and the absence of these proteins on the cell surface (10, 61) suggest that initial virion morphogenesis may occur by budding into intracellular vesicles. More recently, we have confirmed that mature E1-E2 heterodimers do not leave the ER (6), and an ER retention signal has been identified in the C-terminal 29 amino acids of E2 (5).

Folding into a three-dimensional structure in the cell presents a polypeptide chain with some obstacles. First, the nascent polypeptide chain is gradually exposed as it emerges from the ribosome during translation or from the membrane during translocation. Second, many polypeptides are assembled into oligomeric complexes *in vivo*. Finally, they must fold in a concentrated protein solution that presents many opportunities for inappropriate associations. To overcome these hurdles, the cell expresses molecular chaperones and enzymes responsible for preventing misassociations and facilitating proper folding under intracellular conditions. The ER is a specialized compartment devoted to the maturation of membrane and secretory proteins (23). Along with folding enzymes, such as protein disulfide isomerases and prolyl *cis-trans* isomerases (19), the ER contains chaperones including immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP or GRP78) (24), GRP94 (28), calnexin (1), and calreticulin (47, 51, 63).

BiP is a soluble member of the heat shock protein 70 (HSP70) family of chaperones (46), which has been shown to associate transiently with folding intermediates of many viral membrane proteins (13, 18, 27, 36). GRP94 is a member of the heat shock protein 90 (HSP90) family of chaperones (28). Based on its association with unassembled oligomeric protein substrates, such as immunoglobulin chains, major histocompatibility complex class II molecules, and a mutant form of the

* 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.

herpes simplex virus type 1 glycoprotein B, it has been proposed that GRP94 acts as a molecular chaperone (40, 41, 48, 58). Calnexin and calreticulin bind selectively and transiently to newly synthesized glycoproteins (22, 50, 51, 63). Their preference for glycoproteins is based on a lectin-like affinity for monoglucosylated N-linked oligosaccharides (Glc₁Man₉GlcNAc₂) (22, 26, 51, 64). The binding of substrate glycoproteins to and release from calnexin and calreticulin depend on trimming and reglucosylation of the N-linked glycans (22, 26). The monoglucosylated oligosaccharides are generated by trimming the two outermost glucose residues from the core oligosaccharides (31). Glucosidase I removes the first of the three glucoses, and glucosidase II removes the second and eventually the third. Monoglucosylated glycans can also be generated by UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, a luminal enzyme which adds a glucose residue to glucose-free, high-mannose chains of incompletely folded glycoproteins (59, 60). In a recent model (22, 51), the three enzymes, together with calnexin and calreticulin, provide an ER-specific folding and retention machinery. Calnexin and calreticulin are referred to as molecular chaperones, but there is little direct data that they actually influence the folding of glycoprotein substrates. A recent report suggests that calnexin, at least, could act exclusively as a lectin (66).

In this study, we investigated the interactions of ER chaperones with HCV glycoproteins. We showed that BiP, calnexin, and calreticulin interact with E1 and E2, whereas no interaction could be identified between GRP94 and HCV glycoproteins. The kinetics of association of HCV glycoproteins with calnexin, calreticulin, and BiP were determined. The effect of glycosylation inhibitors such as tunicamycin and castanospermine (CST) on chaperone binding and folding was also studied. In addition, vaccinia virus recombinants expressing calnexin, calreticulin, or BiP were constructed and used to coexpress them with E1 and E2 and to analyze the effects of the overexpression of each chaperone on the folding of HCV glycoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The HepG2, CV-1, BHK-21, and 143B (thymidine kinase-deficient) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, Md. Cell monolayers were grown in alpha Eagle's minimal essential medium (alpha MEM; BHK-21) or Dulbecco's modified MEM (HepG2, CV-1, and 143B), both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

Plasmid constructs. Plasmids expressing ER chaperones were constructed by standard methods (57). Sequences encoding calnexin (52), calreticulin (14), and BiP (32) were amplified by PCR to position a 5' *NcoI* (calnexin and calreticulin) or *AflIII* (BiP) site and a 3' *XhoI* site. The PCR products were digested with *NcoI* and *XhoI* or with *AflIII* and *XhoI* and cloned into pTM1 (44) to obtain plasmids pTM1/CNX (calnexin), pTM1/CRT (calreticulin), and pTM1/BiP. BiP expressed from pTM1/BiP contains two additional amino acids (Met and Leu) at the N terminus of its signal sequence. The regions of these plasmids amplified by PCR were verified by sequencing.

Generation and growth of viruses. Vaccinia virus recombinants were generated by homologous recombination essentially as described previously (29) and plaque purified twice on thymidine kinase-deficient 143B cells under bromodeoxyuridine selection (50 µg/ml). Stocks of vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (17), the wild-type vaccinia virus Copenhagen strain and its thermosensitive *ts7* derivative (9), and vaccinia virus recombinants were grown and subjected to titer determination on CV-1 monolayers.

Vaccinia virus-HCV recombinants vHCV1-1488 (expressing C-E1-E2-p7-NS2-NS3₁₈₁), vHCV170-809 (expressing E1-E2-p7), vHCV371-809 (expressing E2-p7), and vHCV1-383 (expressing C-E1) (15, 20, 42) and a vaccinia virus recombinant generated by recombination with pTM1 lacking a foreign sequence (vpTM1 [38]) have been described previously.

Antibodies. Anti-HCV E1 (A4) and E2 (A11 and H2) MAbs have been described previously (6, 10) and were produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Anti-BiP antibodies were purchased from Stress Gen (MAb 10C3; SPA-827) and Affinity Bioreagents (PA1-014) or kindly provided by M.-G. Gething (University of Texas, Dallas, Tex.). Anti-calreticulin antibodies were supplied by Affinity Bioreagents (PA3-

900) or kindly provided by M. Michalak (University of Alberta, Edmonton, Canada). Anti-GRP94 rat MAb (SPA-850) and anti-calnexin antibodies (SPA-860) were supplied by Stress Gen.

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Subconfluent monolayers in 35-mm dishes were infected with the appropriate recombinant at a multiplicity of infection of 5 to 10 PFU per cell. After 1 h at room temperature, medium containing 5% FBS was added. Between 4 and 4.5 h postinfection, monolayers were washed once with prewarmed medium lacking methionine and cysteine and incubated in the same medium for an additional 30 min. Infected cells were then pulse-labeled for 5 or 15 min with 100 µCi of ³⁵S-protein labeling mix (Dupont, NEN) per ml. The cells were washed twice with prewarmed medium containing a 10-fold excess of both methionine and cysteine and then subjected to a chase for various times. The cells were then lysed with 0.5% Triton X-100 in 20 mM Tris-Cl (pH 7.5)-150 mM NaCl-2 mM EDTA (TBS). Iodoacetamide (20 mM) was included in the lysis buffer for experiments in which disulfide bond formation was being investigated. Cell lysates were clarified by centrifugation in an Eppendorf centrifuge for 5 min at 4°C. In steady-state labeling, the cells were labeled, at 4 h postinfection, with 50 µCi of ³⁵S-protein labeling mix per ml in medium containing 1/40 the normal concentration of methionine and 2% FBS.

Immunoprecipitations were carried out as described previously (12). A 6-µl portion of rabbit anti-mouse immunoglobulin G 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 precipitates were then boiled for 5 min in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (under nonreducing conditions, β-mercaptoethanol was omitted) and run on a 10 or 12% polyacrylamide gel (33). After electrophoresis, the gels were treated with sodium salicylate (3), dried, and exposed at -70°C to preflashed Hyperfilm-MP (Amersham). ¹⁴C-methylated protein molecular mass markers were purchased from Amersham. For quantitative experiments, the gels were analyzed with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). 3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and digitonin (1%; Boehringer Mannheim Biochemicals) were used instead of Triton X-100 to solubilize the cells in some experiments. For detection of interactions between BiP and HCV glycoproteins, lysis buffer lacking EDTA was supplemented with apyrase (20 U/ml; Sigma) to deplete the medium of ATP. In some experiments, the cells were treated with tunicamycin (Boehringer Mannheim) or CST (Boehringer Mannheim). Tunicamycin (5 µg/ml) or CST (1 mM) was present during the methionine and cysteine deprivation, the pulse, and the chase.

Western blotting. Analysis of proteins bound to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) was performed by using enhanced chemiluminescence detection (Amersham) as recommended by the manufacturer. Briefly, after separation by SDS-PAGE, proteins were transferred to nitrocellulose membranes by using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad) and revealed with specific antibodies (dilution, 1/1,000) followed by goat anti-mouse or swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase (dilution, 1/1,000; Dako).

RESULTS

Identification of ER chaperones interacting with HCV glycoproteins. Recently, we reported that calnexin transiently associates with HCV glycoproteins (12). To analyze the potential role of other ER chaperones in early steps of HCV glycoprotein folding, cells infected with a vaccinia virus recombinant expressing a truncated form of HCV polyprotein ending after the serine protease domain of NS3 were pulse-labeled for 15 min, lysed, and immunoprecipitated with anti-BiP, anti-calnexin, anti-calreticulin, or anti-GRP94 antibodies. In addition to other unidentified proteins also present in the control, two HCV proteins, E1 and a precursor of E2 (E2-NS2), coprecipitated with BiP, calnexin, and calreticulin but not with GRP94 (Fig. 1). The absence of coprecipitation of HCV glycoproteins with GRP94 was confirmed by immunoprecipitation with anti-E1 or anti-E2 MAbs followed by Western blotting with a GRP94-specific antibody (data not shown). The stability of potential interactions between HCV glycoproteins and GRP94 could be influenced by the detergent used, and, in addition to Triton X-100, other mild detergents (CHAPS and digitonin) were tested to lyse the cells. However, none of these detergents allowed us to detect interactions between GRP94 and HCV glycoproteins (data not shown), suggesting that GRP94 is not involved in the folding of HCV glycoproteins or that the

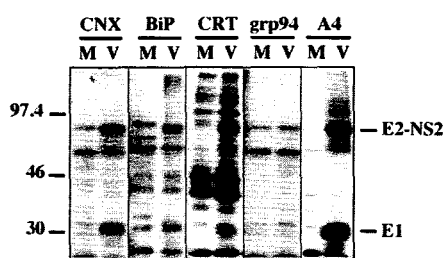


FIG. 1. Coprecipitation of HCV glycoproteins with ER chaperones. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV1-1488 (lanes V) or vTF7-3 and vpTM1 (M). At 4.5 h postinfection, infected cells were labeled for 15 min with [35 S]methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-E1 (control A4), anti-calnexin (CNX), anti-calreticulin (CRT), anti-BiP, or anti-GRP94 antibodies. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). The sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the left.

GRP94-E1 and GRP94-E2 complexes are labile in our experimental conditions.

Interactions between HCV glycoproteins and BiP were also studied by immunoprecipitation with anti-HCV glycoprotein MAbs followed by Western blotting with an anti-BiP antibody. As shown in Fig. 2, interactions between BiP and HCV glycoproteins were confirmed when HCV glycoproteins were precipitated with conformation-insensitive MAbs A4 (anti-E1) and A11 (anti-E2) but not with our conformation-sensitive MAb H2. This was expected since MAb H2 recognizes properly folded E2 and precipitates native HCV glycoprotein complexes but not misfolded aggregates (6). Cell lysis was also performed in the presence of excess ATP (Fig. 2). In this case, coprecipitation of BiP with HCV glycoproteins was dramatically reduced. This latter result is in agreement with previous data showing that the addition of ATP to cell extracts causes the disruption of BiP-substrate complexes (45).

Interactions between HCV glycoproteins and calreticulin were studied as above by immunoprecipitation with anti-HCV glycoprotein MAbs followed by Western blotting with an anti-calreticulin antibody. However, since this chaperone migrates close to the immunoglobulin heavy chain, the two bands could not be resolved (data not shown).

Kinetics of HCV glycoprotein association with calnexin, calreticulin, or BiP. To determine the rate of HCV glycoprotein interactions with calnexin, calreticulin, or BiP, pulse-chase experiments were performed, cell lysates were immunoprecipitated with anti-calnexin, anti-calreticulin, or anti-BiP antibodies, and the coprecipitated HCV glycoproteins were quantified (Fig. 3). The maximum amounts of E1 and E2 that coprecipitated with anti-calnexin or anti-calreticulin antibodies were reproducibly observed during the pulse-labeling, suggesting that HCV glycoproteins associate rapidly with these chaper-

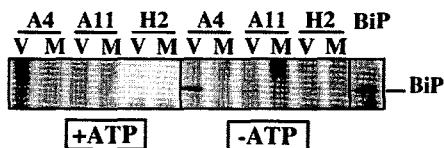


FIG. 2. Western blotting analysis of the interaction between BiP and HCV glycoproteins. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV1-1488 (V) or vTF7-3 and vpTM1 (M). At 5 h postinfection, infected cells were lysed with Triton X-100 in buffer containing or lacking 1 mM ATP. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-E1 (MAb A4), anti-E2 (MAb A11 and H2) or anti-BiP antibodies. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and revealed by Western blotting with an anti-BiP MAb.

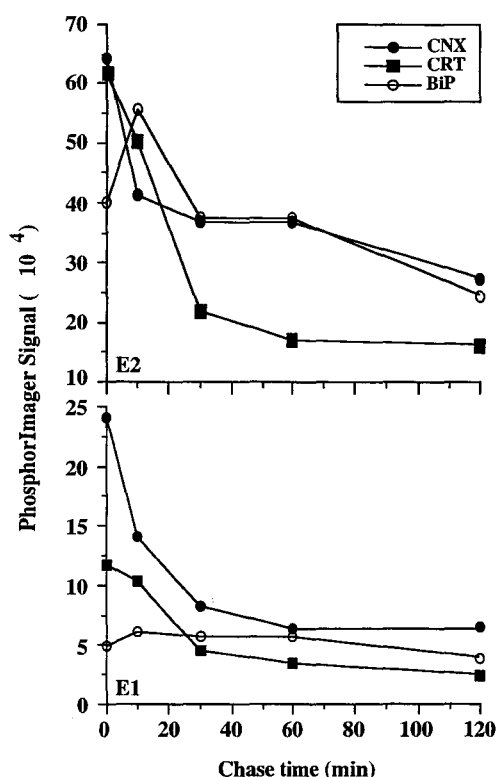


FIG. 3. Kinetics of HCV glycoprotein association with calnexin, calreticulin, and BiP. BHK-21 cells coinfectd with vHCV170-809 and vTF7-3 were pulse-labeled for 5 min with [35 S]methionine and chased for the indicated times. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-BiP, anti-calnexin, or anti-calreticulin antibodies. Proteins were separated by SDS-PAGE, and quantifications of HCV glycoproteins coprecipitated with chaperones were performed with a PhosphorImager.

ones. The intensity of labeled HCV glycoproteins associated with calnexin and calreticulin decreased rapidly during the first 30 min of the chase and then decreased slowly until the end of the chase (Fig. 3). Although the kinetics of association between HCV glycoproteins and calnexin or calreticulin were very similar, the maximum amounts of HCV glycoproteins that coprecipitated after 2 h of chase were smaller for calreticulin. Indeed, only about 20% (E1) and 30% (E2) of the maximum amounts of HCV glycoproteins that coprecipitated with anti-calreticulin antibody were still detected after 2 h of the chase, compared to about 30% (E1) or 50% (E2) of the amounts that coprecipitated with anti-calnexin antibody at the same time. The maximum amount of E2 that coprecipitated with anti-BiP antibody was reproducibly observed after a 10-min chase (Fig. 3), suggesting that E2 associates more slowly with BiP than with calreticulin or calnexin. The intensity of labeled E2 associated with BiP decreased very slowly until the end of the chase. The amount of E1 associated with BiP was small and remained rather constant until the end of the chase. The maximum amounts of E2 that coprecipitated with the chaperones reached about 75% of the total labeled protein for calnexin and calreticulin and 70% for BiP. The maximum amounts of E1 that coprecipitated with calnexin, calreticulin, and BiP were about 40, 20, and 10%, respectively.

Since a large portion of HCV glycoproteins is involved in nonproductive interactions leading to the formation of large aggregates, we analyzed whether some of these ER chaperones would preferentially bind to such aggregates. However, to re-

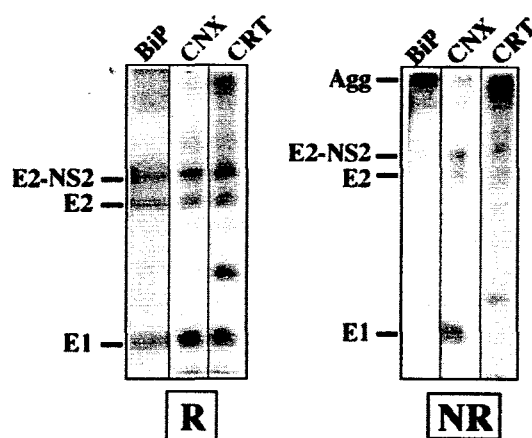


FIG. 4. Analysis of HCV glycoproteins associated with BiP, calnexin (CNX), and calreticulin (CRT) under nonreducing conditions. BHK-21 cells coinfecting with vITF7-3 and vHCV1-1488 were pulse-labeled for 15 min with [35 S]methionine, chased for 10 min, and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-chaperone antibodies, and proteins associated with these chaperones were released by heating for 5 min at 37°C in 0.5% Nonidet P-40 and reprecipitated with MAb A4 (anti-E1). Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing (R) or nonreducing (NR) conditions. Agg, aggregates.

duce the background due to the coprecipitation of other labeled proteins, proteins associated with ER chaperones were released by a mild treatment as previously described (12) and HCV proteins were reprecipitated with anti-E1 or anti-E2 antibodies. Under nonreducing conditions, HCV glycoproteins associated with calnexin were revealed as monomeric bands corresponding to E1 and E2 whereas those associated with calreticulin and BiP antibodies were aggregates (Fig. 4 and data not shown). Similar results were observed at different times of the chase (data not shown). This suggests that proteins recognized by these three chaperones are not in the same state of folding.

Both E1 and E2 interact with ER chaperones. Since the HCV glycoproteins E1 and E2 interact to form E1-E2 complexes (10), coprecipitation of E1 or E2 with anti-chaperone antibodies could reflect an interaction with either or both glycoproteins (or an unlabeled cell component). The ability of each glycoprotein to interact with calnexin, calreticulin, or BiP was analyzed by immunoprecipitation of cells infected by vaccinia virus recombinants expressing E1 or E2 alone. As shown in Fig. 5, E1 expressed in the absence of E2 coprecipitated with anti-calnexin, anti-calreticulin, or anti-BiP antibodies. Similarly, E2 expressed in the absence of E1 coprecipitated with the same anti-chaperone antibodies. These results suggest that each of the HCV glycoproteins can interact with these three chaperones. However, when E1 and E2 were coexpressed, BiP and calreticulin interacted with disulfide-bond complexes composed of E1 plus E2 (Fig. 4, NR). Monomeric forms of E1 or E2 can interact with calnexin early after their synthesis, whereas E1-E2 complexes are observed later during the chase (12). E1-E2 complexes associated with calnexin are detected after 10 or 15 min of the chase (Fig. 4; data not shown), whereas complexes recognized by MAb H2 start to be detected after 45 or 60 min of the chase (reference 6 and data not shown), indicating that noncovalent E1-E2 complexes can be formed before the proteins acquire their final state of folding.

Folding of HCV glycoproteins and association with ER chaperones in the presence of tunicamycin and CST. Although protein-protein interactions cannot be excluded (30, 35, 62),

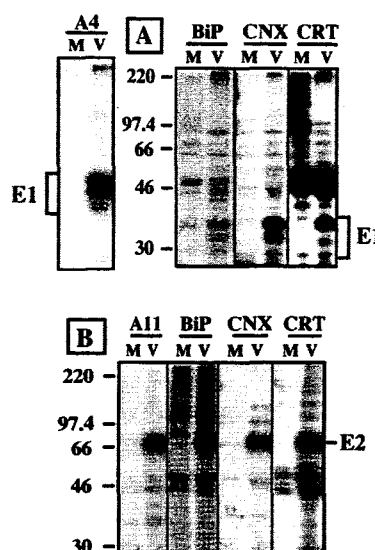


FIG. 5. Interaction of calnexin (CNX), BiP, or calreticulin (CRT) with HCV glycoprotein E1 (A) or E2 (B) expressed alone. BHK-21 cells were coinfecting with vITF7-3 and vHCV1-383 (V, panel A) or vHCV371-809 (V, panel B) or vpTM1 (M). At 4 h postinfection, the cells were labeled for 15 min with [35 S]methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-chaperone (CNX, BiP, and CRT), anti-E1 (MAb A4), or anti-E2 (MAb A11) antibodies. The immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE. The sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the left.

recent studies have confirmed that calnexin and calreticulin bind monoglucosylated N-linked oligosaccharides (55, 64). Tunicamycin blocks core glycosylation of nascent glycoprotein precursors. Therefore, we studied the effect of tunicamycin on the interactions of HCV glycoproteins with calnexin and calreticulin. In the presence of tunicamycin, E1 and E2 had an increased mobility due to the absence of N glycosylation, as previously described (15), and coprecipitation of HCV glycoproteins with calnexin or calreticulin was blocked (Fig. 6). When analyzed under nonreducing conditions, HCV glycoproteins from tunicamycin-treated cells formed large aggregates (data not shown). In addition, when our conformation-sensi-

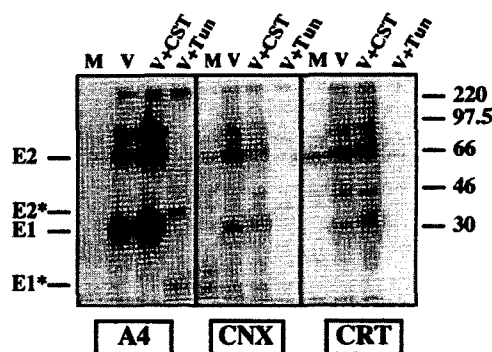


FIG. 6. Effect of CST and tunicamycin (Tun) on the interaction of HCV glycoproteins with calnexin and calreticulin. BHK-21 cells were coinfecting with vITF7-3 and vHCV170-809 (V) or vpTM1 (M). Infected cells were incubated in the presence or absence of 1 mM CST or 5 μ g of tunicamycin per ml, labeled for 30 min with [35 S]methionine in the presence of the same concentrations of drugs, and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with anti-E1 (MAb A4), anti-calnexin (CNX), or anti-calreticulin (CRT) antibodies. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by asterisks. The sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right.

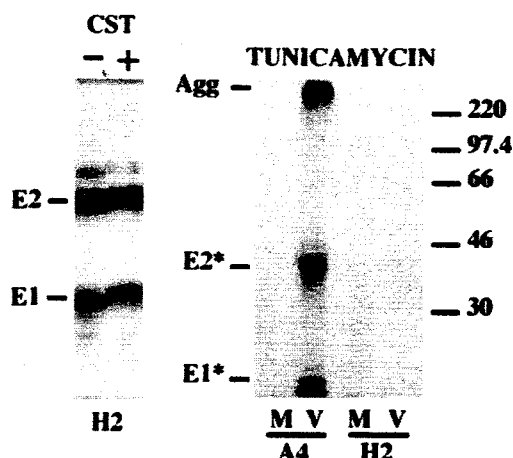


FIG. 7. Formation of native E1-E2 complexes after castanospermine (CST) or tunicamycin treatment, analyzed with the conformation-sensitive MAb H2. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV170-809 (V) or vTF7-3 and vpTM1 (M). Infected cells were incubated in the presence or absence of 1 mM CST or 5 μ g of tunicamycin per ml, labeled for 2 h with [35 S]methionine in the presence of the same concentrations of drugs, and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with a conformation-sensitive (H2) or -insensitive (A4) MAb and analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Agg, aggregates. The sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right.

tive MAb H2 was used, HCV glycoproteins from tunicamycin-treated cells were no longer detected by immunoprecipitation (Fig. 7). These results suggest that in the absence of their N-linked oligosaccharides, HCV glycoproteins are unable to fold properly.

The effect of CST on the interactions of HCV glycoproteins with calnexin and calreticulin was also studied. CST is an α -glucosidase inhibitor that prevents glucose trimming. As such, it inhibits glycoprotein binding to calnexin (22, 26). The mobility of HCV glycoproteins was slightly reduced in CST-treated cells (Fig. 6 and 7), indicating that the trimming of N-linked sugars was inhibited. However, in contrast to what is usually observed for other viral glycoproteins (18, 22, 49, 65), the amount of HCV glycoproteins coprecipitated with calnexin and calreticulin was reproducibly reduced for calnexin and increased for calreticulin (Fig. 6) (see Discussion). For quantitative data, only E1 was analyzed because of the presence of background close to the E2 band. The amounts of E1 coprecipitated with calnexin and calreticulin were approximately 66 and 232%, respectively, of those coprecipitated in the absence of the drug. In addition, the amount of E1 precipitated by MAb A4 was 175% of that precipitated in the absence of the drug, suggesting that the epitope was better exposed in the absence of trimming of the oligosaccharides. In the presence of CST, the formation of HCV glycoprotein aggregates was slightly increased (data not shown). In addition, the amounts of E1 and E2 precipitated by our conformation-sensitive MAb H2 (Fig. 7) were about 80% of those precipitated in the absence of the drug, indicating that the absence of oligosaccharide trimming slightly reduces the formation of native E1-E2 complexes.

Co-overexpression of HCV glycoproteins with ER chaperones does not improve the assembly of native E1-E2 complexes. To further investigate the role of ER chaperones in HCV glycoprotein folding, vaccinia virus recombinants expressing calnexin, calreticulin, or BiP were constructed to co-express these chaperones with HCV glycoproteins. Since the efficiency of folding of HCV glycoproteins is low, we suspected

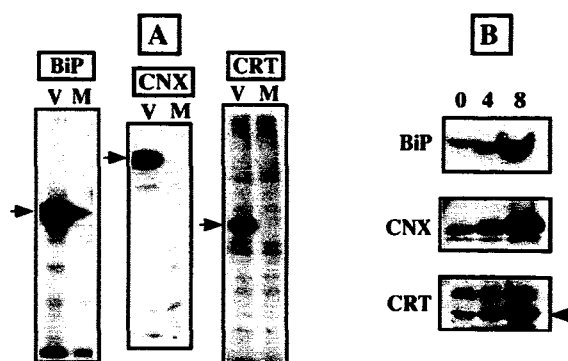


FIG. 8. Expression of the ER chaperones calnexin (CNX), BiP, or calreticulin (CRT) by vaccinia virus recombinants. (A) Analysis of chaperone expression by immunoprecipitation. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus-chaperone recombinant (V) or with vTF7-3 and vpTM1 (M). At 4.5 h postinfection, infected cells were labeled for 2 h with [35 S]methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-chaperone antibodies (CNX, BiP, or CRT) and analyzed by SDS-PAGE. Arrows correspond to the migration level of each chaperone. (B) Analysis of chaperone expression by Western blotting. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus-chaperone recombinant. At 0, 4, or 8 h postinfection, infected cells were lysed with Triton X-100. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and revealed by Western blotting with specific anti-chaperone antibodies.

that the coexpression of these glycoproteins with ER chaperones could improve their folding. The expression of calnexin, calreticulin, or BiP by vaccinia virus recombinants was analyzed by immunoprecipitation with specific antibodies. As shown in Fig. 8A, proteins of the expected molecular size were detected when cells were coinfectd with vTF7-3 and the recombinants expressing ER chaperones whereas no specific band was detected in control cells infected with vTF7-3 plus vpTM1. Because vaccinia virus infection stops host cell protein synthesis (43), metabolically labeled calreticulin, calnexin, or BiP was not detected in control cells infected with vTF7-3 plus vpTM1. The expression of vaccinia virus-chaperone recombinants was confirmed by Western blotting (Fig. 8B). After 8 h of infection, the intensity of the bands corresponding to the chaperones was approximately seven times higher for BiP and four times higher for calnexin and calreticulin.

The formation of HCV glycoprotein complexes in cells co-overexpressing either ER chaperone was analyzed by immunoprecipitation with MAb H2. As shown in Fig. 9, the amounts of E1 coprecipitated with MAb H2 did not increase when calnexin, calreticulin, or BiP was co-overexpressed with HCV glycoproteins; when calnexin was overexpressed, a reduction in the assembly of native E1-E2 complexes was observed in a reproducible fashion. The effects of chaperone overexpression on the assembly of native E1-E2 complexes were also analyzed in pulse-chase experiments, and the results were very similar (data not shown). In addition, simultaneous co-overexpression of calnexin, calreticulin, and BiP with HCV glycoproteins did not improve the folding of these glycoproteins (data not shown).

DISCUSSION

Molecular chaperones are proteins that associate specifically with incompletely folded or unassembled proteins and increase the efficiency with which they acquire their correct three-dimensional structure. In this report, we showed that the ER chaperones calnexin, calreticulin, and BiP interact with HCV glycoproteins. Calreticulin and BiP interacted preferentially

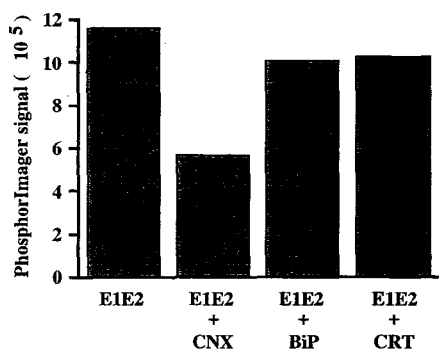


FIG. 9. Effect of the co-overexpression of calnexin (CNX), BiP, or calreticulin (CRT) with HCV glycoproteins on the formation of native E1-E2 complexes. BHK-21 cells were coinfectd with vTF7-3, vHCV170-809, and the appropriate vaccinia virus-chaperone recombinant or vpTM1 (control). At 4.5 h postinfection, infected cells were labeled for 2 h with [³⁵S]methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with the conformation-sensitive MAb H2. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE, and the intensity of coprecipitated E1 was quantified with a PhosphorImager.

with aggregates, whereas calnexin was shown to associate mainly with noncovalent complexes. This suggests that calnexin plays a role in the productive folding of HCV glycoproteins whereas calreticulin and BiP are probably involved in a non-productive pathway of HCV glycoprotein folding.

HCV glycoproteins interact with calnexin and calreticulin. Interactions with calnexin and/or calreticulin have been shown for several viral (18, 22, 49, 51, 65) and nonviral (47, 50–52, 63) glycoproteins. Their preference for interaction with glycoproteins is based on a lectin-like affinity for monoglucosylated N-linked oligosaccharides (22, 26, 51, 64). Binding of substrate glycoproteins to and release from calnexin and calreticulin depend on trimming and reglucosylation of the N-linked glycans (22, 26). The absence of interaction between HCV glycoproteins and calreticulin or calnexin after tunicamycin treatment is consistent with the view that these chaperones act as lectins. However, treatment with CST did not abolish the interaction between HCV glycoproteins and calnexin or calreticulin. Indeed, the binding of HCV glycoproteins to calnexin was reduced whereas their binding to calreticulin was increased. This suggests that binding of HCV glycoproteins to and release from calnexin or calreticulin could be independent of trimming and reglucosylation of the N-linked glycans. In some cases, calnexin associates with nonglycosylated proteins (2). However, this is not the case for HCV glycoproteins. Alternatively, the coprecipitation of HCV glycoproteins with these chaperones, especially calreticulin, observed after CST treatment could be indirect. Indeed, a substantial fraction of HCV glycoproteins remain associated with calnexin and calreticulin for a long time and treatment with CST increases the formation of HCV glycoprotein aggregates. It is therefore very likely that in the presence of CST, neosynthesized glycoproteins form aggregates with preformed complexes composed of HCV glycoproteins trapped with calreticulin. This hypothesis is reinforced by the observation that CST can prevent the disassembly of preformed complexes between calnexin or calreticulin and a glycoprotein (25).

Calreticulin interacts preferentially with aggregates of HCV glycoproteins, whereas calnexin associates preferentially with noncovalent E1-E2 complexes. This suggests that these chaperones recognize HCV proteins which are in different states of folding. Our previous studies suggest that HCV glycoproteins

can follow two different pathways: a productive pathway leading to the formation of noncovalent native E1-E2 complexes or a nonproductive pathway leading to the formation of large aggregates (6, 10, 12). Since the kinetics of association of HCV glycoproteins with calnexin and calreticulin were parallel, it is likely that instead of interacting sequentially with these glycoproteins, calreticulin is involved in one of these two pathways (the nonproductive pathway) and calnexin is involved in the other (the productive pathway). During their folding, proteins composing the native complex have probably been in contact with calnexin. Indeed, this chaperone was shown to interact with noncovalent complexes, and it has been shown previously to associate with the oxidized form of HCV glycoproteins (12). This suggests that calnexin plays an active role in HCV glycoprotein folding. On the other hand, the aggregates observed in the dead-end pathway have probably preferentially interacted with calreticulin. However, these aggregates are stable in cells expressing HCV glycoproteins (6) whereas the complexes formed between HCV glycoproteins and calreticulin are transient. Dissociation of such aggregates from calreticulin could be due to partial folding of the proteins involved in the aggregates. Indeed, it has been shown that a subdomain of E2 can be folded in such aggregates (21) and that the kinetics of formation of this subdomain are parallel to those of dissociation from calreticulin.

HCV glycoproteins interact with BiP. In pulse-chase experiments, the maximum amount of HCV glycoproteins interacting with calnexin or calreticulin was detected during the pulse whereas the binding of HCV glycoproteins (mainly E2) to BiP rose substantially during the first 10 min of the chase. This suggests that HCV glycoproteins could interact sequentially with calnexin (or calreticulin) and BiP. However, analysis under nonreducing conditions indicated that HCV glycoproteins in association with BiP formed aggregates whereas calnexin interacted essentially with noncovalent E1-E2 complexes. Since BiP associates with HCV glycoprotein aggregates, it is more likely that this chaperone plays a role in trapping some aggregates released from calreticulin. Together with calreticulin, BiP could therefore play a role in the nonproductive assembly pathway of HCV glycoproteins.

Co-overexpression of HCV glycoproteins with ER chaperones does not improve the formation of native E1-E2 complexes. Although molecular chaperones are abundant in the ER (37, 56), a majority of these molecules could already be involved in protein-protein interactions, leaving only a fraction of them free to interact with newly synthesized proteins. Since a large portion of HCV glycoproteins is involved in nonproductive interactions, it is possible that, due to the slow folding of HCV glycoproteins, the ER chaperones cannot fully play their role at physiological concentrations. However, overexpression of calnexin, calreticulin, or BiP did not lead to any improvement in the assembly of native HCV glycoprotein complexes, suggesting that some element might be missing in our system. Modulating the expression of ER chaperones has been tried previously. A reduction in the level of the chaperone BiP increases the secretion of proteins associated with BiP (7), whereas overexpression of this chaperone can lead to a reduction of secretion of several proteins (8). Since several chaperones can be involved in assisted folding of proteins in the ER, it is likely that a proper balance of chaperone activities is required for optimal folding. It is also likely that another chaperone(s) and/or foldase(s), which has not been identified in this work, is necessary to assist in HCV glycoprotein folding.

No interaction between HCV glycoproteins and GRP94 has been detected. It is possible that the association of GRP94 and folding intermediates is weak and that cross-linking is required

to detect such an interaction, as it is the case during the folding of the immunoglobulin light chain (41). Alternatively, GRP94 may play no role in the folding and assembly of HCV glycoproteins.

During their folding, HCV glycoproteins interact to form intermediate complexes. Our data suggest that calnexin plays an active role in the folding of HCV glycoproteins. Immediately after their synthesis, monomeric forms of E1 and E2 interact with calnexin. After 10 or 15 min, E1-E2 complexes are detected in association with calnexin, indicating that E1-E2 complexes can be formed before the proteins are extensively folded. Recently, it has been shown that coexpression of E2 is necessary for proper folding of E1 (42), and it is very likely that E2 plays this "chaperone-like" role by interacting directly with E1. This chaperone-like role of E2 could explain the early formation of E1-E2 complexes, which are probably intermediates in the folding of HCV glycoproteins.

Identifying different steps of protein folding in the context of their natural environment is important for our understanding of the mechanisms developed by the cell to help proteins fold properly in subcellular compartments. In addition, a good knowledge of these mechanisms will be helpful to modulate the folding of proteins of interest. In the case of HCV glycoproteins, some folding steps can now be described, but if we want to improve the productive folding of these proteins, additional work is necessary to identify other crucial steps.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M.-J. Gething (University of Texas, Dallas, Tex.), M. Michalak (University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada) and M. Brenner (Harvard Medical School, Boston, Mass.) for the gift of the plasmids containing the sequences of the ER chaperones. We thank Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript and André Pillez for excellent technical assistance.

This work was supported by an ATIPE grant from the CNRS, grant 1039 from the ARC, and grant 5FS10 from the INSERM/AFS.

REFERENCES

- 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.
- Cannon, K. S., D. N. Hebert, and A. Helenius. 1996. Glycan-dependent and independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. *J. Biol. Chem.* 271:14280-14284.
- Chamberlain, J. P. 1979. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.* 98:132-135.
- 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* 244:359-362.
- 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.
- 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.
- Dorner, A. J., M. G. Krane, and R. J. Kaufman. 1988. Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells. *Mol. Cell. Biol.* 8:4063-4070.
- Dorner, A. J., L. C. Wasley, and R. J. Kaufman. 1992. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated protein and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 11:1563-1572.
- 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 D. Moradpour. Unpublished results.
- Dubuisson, J., and C. M. Rice. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* 70:778-786.
- Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms. 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 65:2047-2055.
- Fliegel, L., B. Kimberly, D. H. MacLennan, R. A. F. Reithmeier, and M. Michalak. 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264:21522-21528.
- Fournillier-Jacob, A., A. Cahour, N. Escriu, 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.
- Franki, 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.
- Gaudin, Y. 1997. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J. Virol.* 71:3742-3750.
- Gething, M.-J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.
- 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.
- Habersetzer, F., A. Fournillier, J. Dubuisson, D. Rosa, S. Abrignani, C. Wychowski, I. Nakano, C. Trépo, C. Desgranges, and G. Inchauspé. Unpublished data.
- 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. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:523-529.
- 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.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1996. Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.* 15:2961-2968.
- 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.
- Hurtley, S. M., D. G. Bole, H. Hoover-Litty, A. Helenius, and C. S. Copeland. 1989. Interaction of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J. Cell Biol.* 108:2117-2126.
- Jakob, U., and J. Buchner. 1994. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19:205-211.
- 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.
- Kim, P. S., and P. Arvan. 1995. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 128:29-38.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664.
- Kozutsumi, Y., K. Normington, E. Press, C. Slaughter, J. Sambrook, and M.-J. Gething. 1989. Identification of immunoglobulin heavy chain binding protein as glucose-related protein 78 on the basis of amino acid sequence, immunological cross-reactivity, and functional activity. *J. Cell Sci. Suppl.* 11:115-137.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 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.
- Loo, T. W., and D. M. Clarke. 1994. Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J. Biol. Chem.* 269:28683-28689.
- Machamer, C. E., R. W. Doms, D. G. Bole, A. Helenius, and J. K. Rose. 1990. Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G proteins. *J. Biol. Chem.* 265:6879-6883.
- Marquardt, M., D. Hebert, and A. Helenius. 1993. Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes. *J. Biol. Chem.* 268:19618-19625.
- Martin, A., N. Escriu, S. F. Chao, S. M. Lemon, M. Girard, and C. Wychowski. 1995. Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology* 213:213-222.
- Matsuura, Y., and T. Miyamura. 1993. The molecular biology of hepatitis C virus. *Semin. Virol.* 4:297-304.
- Melnick, J., S. Aviel, and Y. Argon. 1992. The endoplasmic reticulum stress

- protein GRP94, in addition to BiP, associates with assembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**:21303–21306.
41. Melnick, J., J. L. Dul, and Y. Argon. 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* **370**:373–375.
 42. 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.
 43. Moss, B. 1996. Poxviridae: the viruses and their replication, p. 2637–2671. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
 44. Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander, and T. R. Fuerst. 1990. New mammalian expression vectors. *Nature* **348**:91–92.
 45. Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1986. An hsp-70 like protein in the ER: identity with the 78 Kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**:291–300.
 46. Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1986. An HSP-like protein in the ER: identity with the 78 Kd glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**:291–300.
 47. Nauseef, W. M., S. J. McCormick, and R. A. Clark. 1995. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **270**:4741–4747.
 48. Navarro, D., I. Qadri, and L. Pereira. 1991. A mutation in the ectodomain of herpes simplex virus 1 glycoprotein B causes defective processing and retention in the endoplasmic reticulum. *Virology* **184**:253–264.
 49. Otteken, A., and B. Moss. 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J. Biol. Chem.* **271**:97–103.
 50. Ou, W.-J., P. H. Cameron, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bergeron. 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**:771–776.
 51. 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.
 52. Rajagopalan, S., Y. Xu, and M. B. Brenner. 1994. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* **263**:387–390.
 53. 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.
 54. 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.
 55. Rodan, A. R., J. F. Simons, E. S. Trombetta, and A. Helenius. 1996. N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin. *EMBO J.* **15**:6921–6930.
 56. Rowling, P., S. H. McLaughlin, G. S. Pollock, and R. B. Freedman. 1994. A single purification procedure for the major resident proteins of the ER lumen: endoplasmin, BiP, calreticulin and protein disulfide isomerase. *Protein Expression Purif.* **5**:331–336.
 57. 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.
 58. Schaiff, W. T., K. A. Hruska, D. W. McCourt, M. Green, and B. D. Schwartz. 1992. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J. Exp. Med.* **176**:657–666.
 59. Sousa, M., and A. J. Parodi. 1995. The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* **14**:4196–4203.
 60. Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia, and A. J. Parodi. 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* **31**:97–105.
 61. 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.
 62. Van Leeuwen, J. E. M., and K. P. Kears. 1996. Calnexin associates exclusively with individual CD3d and T cell antigen receptor (TCR) a protein containing incompletely trimmed glycans that are not assembled into multisubunit TCR complexes. *J. Biol. Chem.* **271**:9660–9665.
 63. 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.
 64. Ware, F. E., A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman, and D. B. Williams. 1995. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**:4697–4704.
 65. Yamashita, Y., K. Shimokata, S. Mizuno, T. Daikoku, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama. 1996. Calnexin acts as a molecular chaperone during the folding of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:2237–2246.
 66. Zapun, A., S. M. Petrescu, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bergeron. 1997. Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell* **88**:29–38.

Discussion de l'article « Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins ».

I. Introduction

Notre objectif, en initiant ce travail, était de mettre en évidence les chaperons du RE qui interviennent dans le repliement des glycoprotéines du VHC, et de surexprimer ces chaperons afin d'obtenir une amélioration dans l'efficacité d'assemblage du complexe E1E2 natif. Les premiers résultats obtenus dans le laboratoire indiquaient que le chaperon CNX interagit avec les glycoprotéines E1 et E2 (Dubuisson and Rice 1996). Par conséquent, nous voulions savoir si d'autres chaperons pouvaient interagir avec ces protéines et être potentiellement impliquées dans leur repliement.

II. Identification des chaperons qui interagissent avec les glycoprotéines du VHC

1. Les chaperons BiP, CNX et CRT interagissent avec les glycoprotéines du VHC

Il avait déjà été montré dans notre laboratoire que la CNX interagissait avec les glycoprotéines du VHC (Dubuisson and Rice 1996). Nos expériences de marquage métabolique, suivi d'une immunoprécipitation par l'anticorps anti-CNX nous ont permis de confirmer ce résultat (Figure 1 de l'article). Dans ces conditions, nous avons aussi mis en évidence une interaction des chaperons BiP et CRT avec les glycoprotéines du VHC. Nous n'avons cependant pas observé de coprécipitation des glycoprotéines E1 et E2 avec le chaperon grp94, et l'absence de coprécipitation de ce chaperon a aussi été confirmée en Western-blotting (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que le chaperon grp94 ne serait pas impliqué dans le repliement des glycoprotéines E1 et E2. Nous ne pouvons cependant pas exclure que cette interaction soit labile dans nos conditions d'expérience.

De la même manière que pour la grp94, nous avons vérifié l'interaction des glycoprotéines du VHC avec les chaperons BiP, CNX et CRT par immunoprécipitation avec des anticorps anti-E1 ou anti-E2 suivie d'une révélation en Western-blotting (Figure 2 de l'article, Dubuisson and Rice 1996). La révélation s'est avérée être positive dans le cas de la BiP et de la CNX, néanmoins, la comigration des chaînes lourdes d'immunoglobulines et de la CRT n'ont pas

permis de visualiser l'interaction de ce chaperon avec les glycoprotéines virales par cette technique.

2. Chacune des glycoprotéines du VHC interagit avec les chaperons BiP, CNX et CRT

Etant donné que les glycoprotéines du VHC s'assemblent sous forme de complexes (Deleersnyder, et al. 1997), leur interaction avec les chaperons pouvait avoir lieu dans le contexte de ces complexes. Dans ce cas, l'interaction entre les chaperons et les complexes E1E2 pouvait se faire par l'intermédiaire d'une seule des deux glycoprotéines. Nous nous sommes donc intéressés à savoir si chacune de ces glycoprotéines était capable d'interagir avec les chaperons BiP, CNX et CRT. Pour Cela, les glycoprotéines virales ont été exprimées individuellement et leur capacité à interagir avec les chaperons a été analysée par immunoprécipitation. Ainsi, l'immunoprécipitation des glycoprotéines E1 et E2 exprimées seules par les anticorps anti-chaperons a montré que chacune des glycoprotéines E1 et E2 du VHC interagit avec les chaperons BiP, CNX et CRT (Figure 5 de l'article).

III. Modalités d'interaction des chaperons BiP, CNX et CRT avec les glycoprotéines du VHC

1. L'interaction du chaperon BiP est modulée par l'ATP

La protéine BiP possède un site de fixation à l'ATP, qui apparaît primordial pour sa fonction de chaperon (voir **chapitre II**). Nous avons voulu voir si ce site était important pour l'interaction de BiP avec les glycoprotéines du VHC. Ainsi, la déplétion en ATP du lysat cellulaire, préalablement à son immunoprécipitation par les anticorps anti-E1 (A4) et anti-E2 (A11) a permis une révélation du chaperon BiP en Western-blotting (Figure 2 de l'article). A l'inverse, l'ajout d'ATP dans le milieu de lyse induit la disparition de la coprécipitation de BiP avec les glycoprotéines du VHC. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes qui ont montré un relargage de la protéine associée à BiP suite à la fixation d'ATP sur son site ATPasique, indépendamment de son hydrolyse (Palleros, et al. 1993, Wei, et al. 1995a, Wei and Hendershot 1995b).

2. Les interactions avec les chaperons CNX et CRT sont dépendantes des glycannes

Bien qu'une interaction protéine-protéine ne puisse pas être exclue lors de l'association de la CNX et de la CRT avec leur substrat glycoprotéique, il a été montré que ces deux chaperons lient spécifiquement ces dernières via leurs N-glycannes monoglucosylés (Trombetta and Helenius 1998). Dans le but de confirmer que ce mode d'interaction existe aussi pour les glycoprotéines du VHC, nous avons traité les cellules infectées par la tunicamycine ou la castanospermine, préalablement à leur immunoprécipitation par les anticorps anti-CNX et anti-CRT (Figure 6 de l'article).

- En présence de tunicamycine, qui bloque la glycosylation des protéines néosynthétisées, on observe une absence de coprécipitation des glycoprotéines du VHC avec les chaperons CNX et CRT. De plus, l'absence de reconnaissance de ces protéines non glycosylées par un anticorps qui est dépendant de la conformation (H2) suggère que ces protéines n'ont pas atteint leur état natif (Figure 7 de l'article). Ces résultats suggèrent d'une part, que la CNX et la CRT ont une interaction de type lectinique avec leur substrat, et d'autre part, que les glycoprotéines du VHC sont incapables de se replier correctement en l'absence de leur glycannes. En effet, en présence de tunicamycine les glycoprotéines du VHC forment de larges agrégats (résultat non montré).

- La castanospermine (CST) est un inhibiteur des α -glucosidases I et II qui est communément utilisé pour montrer la spécificité d'interaction des lectines CNX et CRT avec les glycoprotéines monoglucosylées (voir **chapitre II**). En présence de cet inhibiteur, il est en effet possible d'empêcher l'interaction des glycoprotéines, alors majoritairement triglucosylées, avec ces chaperons. Nous avons cependant pu observer la coprécipitation des glycoprotéines du VHC par les anticorps anti CNX et anti-CRT, après traitement des cellules à la CST (Figure 6 de l'article). A la lumière de ces observations et contrairement à ce qui a déjà été montré pour de nombreuses glycoprotéines, l'association des glycoprotéines du VHC avec les chaperons lectiniques ne semble pas dépendre de la monoglucosylation de leurs glycannes. Néanmoins, il pourrait s'agir d'un artéfact dont l'origine s'expliquerait par les données suivantes:

- Des complexes glycoprotéines du VHC-CN_X (ou CRT) peuvent se former avant le marquage métabolique et le traitement à la CST.
- Le traitement par la CST semble induire une augmentation de l'agrégation des glycoprotéines du VHC (résultats non montrés).
- La CST stabilise les complexes glycoprotéine-CN_X formés (ou -CRT) avant le traitement (Hebert, et al. 1996).

L'ensemble de ces observations laissent à penser qu'une interaction indirecte des glycoprotéines marquées, via leur association avec des complexes glycoprotéines froides-CN_X (ou CRT), pourrait être à l'origine du signal détecté après immunoprécipitation par les anticorps anti-chaperons.

Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, la CRT s'associe préférentiellement aux agrégats formés par les glycoprotéines du VHC. Par conséquent, l'augmentation de l'intensité des bandes, correspondant aux glycoprotéines virales immunoprécipitées par l'anticorps anti-CRT, lors du traitement par la CST pourrait être due à une agrégation préférentielle des glycoprotéines marquées avec les complexes préformés entre la CRT et des agrégats froids (Figure 6 de l'article).

IV. Implication des chaperons BiP, CNX et CRT dans les deux voies d'assemblage des glycoprotéines du VHC

En présence d'inhibiteur de glucosidase, nous avons pu observer une diminution de 20% de la reconnaissance des complexes E1E2 natifs par notre anticorps dépendant de la conformation H2 (Figure 7 de l'article). Par conséquent, il semble que l'absence de maturation des glycannes des glycoprotéines du VHC soit à l'origine d'une réduction de la formation des complexes natifs E1E2. Dans le but de déterminer si cette diminution de la formation des complexes natifs était due à un défaut d'interaction des glycoprotéines du VHC avec la CNX ou la CRT, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'état conformationnel des complexes E1E2 en interaction avec ces chaperons.

1. Analyse de l'état conformationnel des glycoprotéines du VHC en interaction avec les chaperons BiP, CNX et CRT

Comme nous l'avons déjà mentionné (voir paragraphe C., page 66), les glycoprotéines du VHC s'assemblent selon deux voies, conduisant respectivement à la formation de complexes natifs (voie productive) et d'agrégats (voie non productive). Nous nous sommes donc demandés si chacun des chaperons BiP, CNX et CRT était effectivement impliqué dans la voie productive d'assemblage des glycoprotéines du VHC en complexes natifs.

L'absence de coprécipitation du chaperon BiP avec les glycoprotéines du VHC natives a été mise en évidence en Western-blotting, après immunoprécipitation du lysat par notre anticorps H2 dépendant de la conformation (Figure 2 de l'article). De plus, l'analyse en conditions non réductrices des glycoprotéines immunoprécipitées par l'anticorps anti-BiP a montré que ce chaperon interagit essentiellement avec les agrégats des glycoprotéines du VHC (Figure 4 NR de l'article). Ces observations suggèrent que la protéine BiP s'associe plutôt avec les glycoprotéines du VHC engagées dans la voie non productive d'assemblage (agrégats). Le même résultat a pu être observé pour la CRT, cependant, les glycoprotéines du VHC immunoprécipitées par l'anticorps anti-CNX présentent un profil de migration différent en milieu non réducteur. En effet, les glycoprotéines E1 et E2 (E2-NS2) migrent sous leur forme

monomérique, ce qui indique qu'elles sont probablement associées à la CNX sous forme de complexes non-covalents E1E2, ceci après 10 à 15 minutes de chasse (Figure 4 NR de l'article et résultat non montré). De plus, des résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire indiquent que la glycoprotéine E1 acquiert son état oxydé lorsqu'elle est en interaction avec la CNX (Dubuisson and Rice 1996). L'ensemble de ces données suggère que la CNX est impliquée dans la voie de repliement productive des glycoprotéines du VHC (complexes natifs).

2. Cinétique d'association-dissociation des glycoprotéines du VHC avec les chaperons BiP, CNX et CRT

Afin d'étudier la cinétique d'association-dissociation des glycoprotéines du VHC avec les chaperons BiP, CNX et CRT, nous avons entrepris des expériences de marquage-chasse, suivies d'immunoprécipitations par les anticorps anti-chaperons. Puis, nous avons quantifié les molécules du VHC associées à ces chaperons (Figure 3 de l'article).

La CNX et la CRT présentent un profil d'interaction similaire avec les glycoprotéines E1 et E2. Ce profil est caractérisé par une association très rapide (dès le début de la chasse), suivi d'une dissociation en deux phases (la première étant rapide et la seconde plus lente). Comme nous avons vu que chacun de ces chaperons est engagé dans une voie différente de formation des complexes E1E2, il est très probable que la CNX et la CRT n'agissent pas de façon séquentielle.

De la même façon que la CRT, la BiP s'associe aussi avec les agrégats des glycoprotéines du VHC. Cependant, son profil d'interaction montre que le maximum de glycoprotéines coprécipitées est observé après 10 minutes de chasse, suggérant une action séquentielle de ce chaperon avec la CRT. De plus, la dissociation de la BiP se fait en deux phases pour E2 (l'une rapide, l'autre lente), alors qu'elle apparaît quasi nulle pour E1 (Figure 3 de l'article). Ainsi, la glycoprotéine E1 semble présenter une association stable avec la BiP, suggérant que la majorité des glycoprotéines E1 en interaction avec ce chaperon sont irréversiblement engagées dans la voie non productive. Dans le cas de la glycoprotéine E2, la phase de dissociation plus rapide indique qu'une partie du « pool » de cette glycoprotéine a acquis une structure conformationnelle qui ne permet plus la reconnaissance par le chaperon BiP. Il est alors possible que parmi les glycoprotéines E2 qui s'associent initialement à BiP, certaines d'entre elles acquièrent leur forme oxydée ($T_{1/2} \approx 15$ min) et soient ainsi orientées vers la voie productive de repliement correct. Alternativement, ces glycoprotéines pourraient former des agrégats qui ne seraient plus reconnus par BiP. En effet, comme nous le verrons dans l'article II, les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC sont très stables dans le temps.

V. La surexpression des chaperons BiP, CNX et CRT ne permet pas d'augmenter le rendement de formation des complexes natifs

L'inefficacité de repliement et d'assemblage des glycoprotéines du VHC en complexes natifs pourrait être due à la présence en quantité limitée des chaperons du RE. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'infection des cellules HepG2 par le virus vaccine recombinant exprimant les glycoprotéines virales provoque:

- un apport « massif » de protéines exogènes (les glycoprotéines E1 et E2, et les autres protéines du VHC), synthétisées et mises en conformation grâce à la machinerie cellulaire.

- un arrêt de la synthèse des protéines cellulaires endogènes, dont les chaperons BiP, CNX et CRT. Le « pool » préexistant de ces protéines chaperons (avant infection) doit donc être capable d'assurer à lui seul l'aide au repliement et à l'assemblage des glycoprotéines virales. Par conséquent, nous avons voulu évaluer si l'apport de chaperons exogènes pouvait améliorer l'efficacité de repliement et d'assemblage des glycoprotéines du VHC. Nous avons donc coinfesté les cellules avec des virus vaccine recombinants exprimant les chaperons BiP, CNX ou CRT (Figure 8 de l'article). Nous avons ensuite quantifié l'efficacité de repliement des glycoprotéines E1 et E2, à l'aide de notre anticorps H2, spécifique des complexes non-covalents de la voie productive (Figure 9 de l'article). Contrairement à nos attentes, aucune amélioration n'a été observée dans le repliement et l'assemblage de ce complexe, quelque soit le chaperon coexprimé. La surexpression simultannée des trois chaperons BiP, CNX et CRT a conduit aux mêmes observations (résultat non montré).

Les causes de ces résultats peuvent être multiples. Parmi elles, citons:

- La modification de l'équilibre physiologique des protéines réticulaires tels que les chaperons peut conduire à une perturbation de leur fonction. Ceci expliquerait pourquoi la quantité d'hétérodimères natifs se trouve diminué de 50%, lors de la surexpression de la CNX, dont le rôle supposé serait normalement d'optimiser la formation des complexes natifs.

- L'intervention éventuelle, directe ou indirecte, d'autres protéines du RE dont nous ne tenons pas compte dans notre système de surexpression.

Parmi les chaperons du RE, la modulation de l'expression de BiP/grp78 a déjà été étudiée par plusieurs équipes. Ainsi, la diminution de la quantité endogène de la BiP par introduction de gènes grp78 antisens dans des cellules CHO a permis d'augmenter la sécrétion d'un variant de l'activateur du plasminogène, sous sa forme fonctionnelle (Dorner, et al. 1988). A l'inverse, la surexpression stable de BiP, dans ces mêmes cellules, a conduit à la diminution de la sécrétion de protéines hétérologues (Dorner, et al. 1992). Ces résultats suggèrent que dans le cas des protéines sécrétées qui présentent une interaction avec la BiP, ce chaperon est impliqué dans la modulation de la sécrétion et n'apparaît pas avoir de rôle majeur dans l'amélioration du repliement.

VI. Conclusion

Les glycoprotéines du VHC interagissent avec les chaperons BiP, CNX et CRT. Alors que les protéines BiP et CRT semblent s'associer préférentiellement avec les glycoprotéines E1 et E2 engagées dans la voie non productive de formation des agrégats, la CNX interagit de façon précoce avec les complexes non-covalents E1E2 (incomplètement repliés) jusqu'à ce qu'ils aient atteint leur forme native. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le mode de fonctionnement ainsi que le rôle potentiel de chacun de ces chaperons dans la maturation des glycoprotéines du VHC. Néanmoins, il reste encore à définir certaines étapes cruciales du repliement de ces glycoprotéines, afin de favoriser la formation des hétérodimères non-covalents dont l'étude apparaît essentielle pour l'étude du cycle viral.

4. L'agrégation des glycoprotéines du VHC: une propriété intrinsèque du virus?

Comme nous l'avons déjà mentionné dans ce mémoire (paragraphe C.3., page 68), la tendance des glycoprotéines du VHC à former des agrégats ne semble résulter ni du clone infectieux utilisé, ni du système d'expression employé. Par conséquent, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de ces agrégats, dans le but d'éclaircir leur rôle éventuel dans le cycle viral du VHC.

Ainsi, nous avons tenté de caractériser les agrégats formés par les glycoprotéines E1 et E2, grâce à la production d'un anticorps spécifique obtenu dans notre laboratoire. Ce travail a fait l'objet d'un article, actuellement soumis pour publication dans *Journal of General Virology*, et intitulé « **Characterization of Aggregates of Hepatitis C virus Glycoproteins** » (1999).

ARTICLE II

**"Characterization of Aggregates of Hepatitis C virus
Glycoproteins"**

Characterization of Aggregates of Hepatitis C Virus Glycoproteins

AMÉLIE CHOUKHI¹, ANDRÉ PILLEZ¹, HERVÉ DROBECQ², CHRISTIAN
SERGHERAERT², CZESLAW WYCHOWSKI¹, AND JEAN DUBUISSON^{1*}

*Institut de Biologie de Lille/Institut Pasteur de Lille,
(1) CNRS-UMR 319 & (2) CNRS-URA 1309,
BP447, 59021 Lille cedex, France.*

Running title: HCV glycoprotein aggregates

N° of words:	Summary	228 words
	Main text	4037 words

N° of figures: 8

* Corresponding author. Mailing address: Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 8526, 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

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) encodes two glycoproteins, E1 and E2, which assemble in oligomeric structures. Studies of HCV glycoprotein assembly using heterologous expression systems have shown that these glycoproteins can follow two pathways: a productive pathway leading to the formation of a noncovalent heterodimer and a nonproductive pathway leading to the formation of large disulfide-linked aggregates. The noncovalent HCV glycoprotein complex is probably the functional complex which will play an active role in the entry process in host cells. The aggregates are believed to be waste products; however, one can imagine that, in infected cells, they could provide HCV glycoproteins with additional functions. To further understand the potential role played by HCV glycoprotein aggregates in HCV infection, we produced a MAb (H14) which specifically recognizes these aggregates but not the noncovalent E1E2 heterodimer. The H14 epitope was shown to be present on both HCV glycoproteins and was sensitive to deglycosylation. HCV glycoprotein aggregates were detected in a small proportion of the infected cells, suggesting that their formation is influenced by the physiological state of the cells. An additional characterization of HCV glycoprotein aggregates with the help of MAb H14, indicates that they share an epitope with a cellular protein called Mac-2 binding protein. The presence of such an epitope on HCV glycoprotein aggregates could potentially lead to the production of autoantibodies recognizing Mac-2 binding protein in HCV-infected patients.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) encodes two glycoproteins, E1 and E2, which assemble in oligomeric structures (Dubuisson *et al.*, 1994, Grakoui *et al.*, 1993, Lanford *et al.*, 1993, Ralston *et al.*, 1993). Purified HCV glycoprotein complexes expressed by using vaccinia virus recombinants have been shown to be noncovalently associated (Ralston *et al.*, 1993). In contrast, a fraction of E1 and E2 present in lysates of cells infected with vaccinia-HCV recombinants has been reported to be associated via disulfide linkages (Grakoui *et al.*, 1993). Other studies on the formation of intracellular complexes have shown that, in the presence of nonionic detergents, two forms of E1E2 complexes are detected: a heterodimer of E1 and E2 stabilized by noncovalent interactions, and disulfide-linked aggregates (Dubuisson *et al.*, 1994, Dubuisson & Rice, 1996). Additional studies indicate that the noncovalent heterodimer is composed of native HCV glycoproteins whereas the disulfide-linked aggregates are formed by misfolded proteins (Deleersnyder *et al.*, 1997). The formation of stable noncovalent E1E2 complexes is slow ($t_{1/2} \approx 2\text{h}$) and it is due to the slow folding of these proteins. Indeed, formation of intramolecular disulfide bonds is slow for E1 (Dubuisson & Rice, 1996) and unidentified events following the acquisition of intramolecular disulfide bonds limit the folding of E2 (Deleersnyder *et al.*, 1997, Dubuisson & Rice, 1996, Habersetzer *et al.*, 1998, Michalak *et al.*, 1997). 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 (Michalak *et al.*, 1997). The noncovalent heterodimeric complex is believed to be the prebudding form of HCV glycoprotein oligomer and accumulates in the endoplasmic reticulum (ER) (Deleersnyder *et al.*, 1997). The transmembrane domains of E1 and E2 have been shown to be major determinants for ER localization of these proteins (Cocquerel *et al.*, 1999, Cocquerel *et al.*, 1998, Duvet *et al.*, 1998).

There are several possible fates for newly synthesized proteins inside cells. The major distinction between these fates is whether a protein succeeds in folding correctly, or whether it aggregates. Aggregation has been commonly regarded as a nuisance which affects in vitro protein refolding studies. It is now apparent that aggregation is also a problem within cells (Dobson & Ellis, 1998, Thomas *et al.*, 1995). In the intracellular environment, the competition between

folding, aggregation and degradation determines whether a polypeptide can achieve its functional state with the efficiency required for successful cell growth, or whether it aggregates into a state that causes cellular damage. Evidence is accumulating that many disease-causing mutations and modifications exert their effects by altering protein folding. Cystic fibrosis is an example of a genetic disease where a variant protein is unable to fold correctly to a stable state in the ER and fails to reach the plasma membrane, eventually being degraded (Cheng *et al.*, 1990, Denning *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1992). Interestingly, even the wild-type chains do not fold with high efficiency; only about 30% of wild-type chains survive the quality-control mechanisms of the ER. Aggregation is currently seen as a specific process, which may be amplified by the high concentration of identical nascent chains emerging from polysomes (Dobson & Ellis, 1998).

Studies of reactivity with conformation-sensitive monoclonal antibodies (MAbs) and analysis of protease sensitivity indicate that the production of properly assembled E1E2 oligomers is inefficient (Deleersnyder *et al.*, 1997). This does not seem to be due to mutations introduced during cDNA synthesis or PCR amplification of the original clone used in these studies. Indeed, similar results are obtained with a vaccinia recombinant expressing the sequence of the structural proteins of a recently characterized infectious cDNA clone (Kolykhalov *et al.*, 1997) (Dubuisson and Rice, unpublished data). Aggregates of HCV glycoproteins were first observed when expressed by viral vectors such as vaccinia virus and Sindbis virus which can induce a high level of protein synthesis (Dubuisson *et al.*, 1994, Grakoui *et al.*, 1993). However, such aggregates have also been reported when HCV proteins are expressed in a non-viral vector which drives a lower level of protein synthesis (Duvet *et al.*, 1998). This tendency to aggregate is therefore probably an intrinsic property of HCV glycoproteins. Indeed, slow folding of HCV glycoproteins may increase the fraction of these proteins shunted into a competing nonproductive pathway, such as aggregation (Fischer & Schmid, 1990). In this study, we produced a MAb which specifically reacts with HCV glycoprotein aggregates but not with noncovalently associated glycoproteins. A characterization of these aggregates indicates that they share a common epitope with a cellular protein and they are expressed in a small proportion of the infected cells.

METHODS

Cell culture. HepG2 and CV-1 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell monolayers were grown in Dulbecco's modified MEM (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

Viruses. vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (Fuerst *et al.*, 1986), Vaccinia virus-HCV recombinants vHCV1-1488 (expressing CE1E2p7NS2NS3₁₄₈₈), vHCV170-809 (E1E2p7), vHCV371-809 (E2p7) and vHCV1-383 (CE1) (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996, Grakoui *et al.*, 1993, Michalak *et al.*, 1997), and vaccinia virus recombinants expressing truncated forms of HCV glycoproteins [vHCV170-311 (E1₃₁₁), vHCV170-361 (E1₃₆₁), vHCV371-715 (E2₇₁₅) and vHCV371-661 (E2₆₆₁)] (Michalak *et al.*, 1997) were used in this work. The Sindbis virus recombinant expressing a truncated form of HCV polyprotein (amino acid residues 1 to 1207: SINrep/HCV-H1-1207) has been described (Dubuisson *et al.*, 1994).

Antibodies. Anti-HCV E1 (A4) and E2 (H2 and H47) MAbs have been described previously (Deleersnyder *et al.*, 1997, Dubuisson *et al.*, 1994) (Pillez and Dubuisson, unpublished data) and were produced in vitro by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. To produce other MAbs, HepG2 cells coinfecting with vTF7-3 and vHCV1-1488 were lysed with 0.5% NP-40 in Tris buffered saline (TBS: 20 mM Tris-Cl, pH 7.4; 137 mM NaCl). HCV glycoproteins were purified by immunoaffinity on Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) with anti-E1 MAb A4. HCV glycoprotein complexes bound to the immunobeads were injected into BALB/c mice to produce HCV-specific, antibody-secreting hybridomas as described (Harlow & Lane, 1988). Screening was performed in 96-well plates containing HepG2 cells that had been coinfecting with vTF7-3 and vHCV1-1488, and fixed with isopropanol as described (Dubuisson *et al.*, 1994). Anti-Mac-2 binding protein (M2BP) antibody was kindly provided by R. Timpl (Max Planck Institute für Biochemie, Martinsried, Germany).

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Subconfluent monolayers in 35-mm dishes were infected with the appropriate recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU per cell. After 1 h, medium containing 5% FBS was added. Between 4 and 4.5 h postinfection, monolayers were washed once with prewarmed medium lacking methionine and cysteine, and incubated in the same medium for an additional half hour. Infected cells were then pulse-labeled for 5 min with 100 μ Ci of 35 S-Protein Labeling Mix (NEN Life Science Products) per ml. Cells were washed twice with prewarmed medium containing 10-fold excess methionine and cysteine, followed by a chase for various times. Cells were then lysed with 0.5% TBS. Iodoacetamide (20 mM) was included in the lysis buffer for experiments in which disulfide bond formation were determined. Cell lysates were clarified by centrifugation in an Eppendorf centrifuge for 5 min at 4°C. In steady-state labeling, cells were labeled at 4 h postinfection with 50 μ Ci of 35 S-Protein Labeling Mix (NEN Life Science Products) per ml in medium lacking methionine and cysteine. Immunoprecipitations were carried out as described (Dubuisson & Rice, 1996). The precipitates were boiled for 5 min in SDS-PAGE sample buffer (under nonreducing conditions, β -mercaptoethanol was omitted) and run on a 10% polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). After electrophoresis, gels were treated with sodium salicylate (Chamberlain, 1979), dried and exposed at -70°C to preflashed Hyperfilm-MP (Amersham Pharmacia Biotech). 14 C-methylated protein molecular mass markers were purchased from Amersham Pharmacia Biotech.

Western blotting. For Western blotting studies, proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham Pharmacia Biotech) by using a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). After transfer, nitrocellulose membranes were incubated with specific antibodies (MAb or polyclonal antibody) followed by goat anti-mouse or swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase or alkaline phosphatase (DAKO) as described (Harlow & Lane, 1988). The presence of proteins specifically recognized by the primary antibody was revealed by chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) as recommended by the manufacturer or with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate/nitro blue tetrazolium alkaline phosphatase substrate (Sigma).

Immunofluorescence and alkaline phosphatase detection. Cells grown on coverslips were infected with the appropriate recombinant virus expressing HCV glycoproteins. At 8 h postinfection, cells were fixed for 10 min at 4°C with isopropanol. For immunofluorescence detection, cells were stained for 2 h at room temperature with MAb H14 (diluted 1/200), followed by incubation for 1 h at room temperature with donkey anti-mouse (Rhodamine) immunoglobulins (diluted 1/100; Jackson ImmunoResearch). For alkaline phosphatase detection, cells were stained for 2 h at room temperature with MAb H14 (diluted 1/200) or A4 (diluted 1/400), followed by incubation for 1 h at room temperature with rabbit anti-mouse (alkaline phosphatase) immunoglobulins (diluted 1/200; DAKO) and revealed with 5-bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium alkaline phosphatase substrate (Sigma).

Amino acid sequencing. Internal amino acid sequences were determined as described (Rosenfeld *et al.*, 1992). Briefly, the cellular protein recognized by MAb H14 was purified by immunoprecipitation as described (Harlow & Lane, 1988) and separated by SDS-PAGE. After Coomassie Blue staining, the band of interest was cut and treated with acetonitrile and ammonium carbonate to clear the sample of impurity. After a Speedvac dehydration, the protein was digested with endoproteinase Lys-C (Boehringer-Mannheim) at 37°C for 18h. Peptides of interest were purified by reversed-phase HPLC, eluted with acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, lyophilized, and sequenced in an automated microsequencer.

RESULTS

Identification of a MAb which specifically recognizes aggregates of HCV glycoproteins.

HCV glycoproteins have a tendency to aggregate and recent data suggest that this tendency to form aggregates is probably an intrinsic property (Dubuisson, 1999, Duvet *et al.*, 1998). To better characterize HCV aggregates, we produced a MAb which specifically recognizes disulfide linked HCV glycoproteins but not the noncovalently associated proteins. For this purpose, MAbs were screened by immunoprecipitation followed by SDS-PAGE analysis under nonreducing conditions to select those which only precipitate large aggregates. One MAb (H14) showed the expected pattern (Fig. 1). When analyzed under nonreducing conditions, proteins precipitated by H14 migrated as large aggregates. Under reducing conditions, MAb H14 precipitated both E1 and E2 similarly to what was observed with conformation-sensitive (H2) (Deleersnyder *et al.*, 1997) or -insensitive (A4) (Dubuisson *et al.*, 1994) MAbs. For MAb H2, the pattern was similar under nonreducing and reducing conditions. For MAb A4, bands corresponding to E1 and E2 as well as heterogeneous aggregates were observed under nonreducing conditions. It is worth noting that MAb H2 precipitates the oxidized forms of E1 and E2 only (Deleersnyder *et al.*, 1997) whereas MAb A4 precipitates both the reduced and oxidized forms of at least E1 (Dubuisson & Rice, 1996) (Fig. 1). Together these data indicate that MAb H14 is a new tool to characterize HCV glycoprotein aggregates.

MAb H14 recognizes a cellular protein as well as HCV glycoprotein aggregates.

We have previously shown that ER chaperones BiP and calreticulin interact with aggregates of HCV glycoproteins (Choukhi *et al.*, 1998). Based on these data, we wanted to know whether the epitope recognized by MAb H14 is present on HCV glycoprotein aggregates or whether it recognizes an ER chaperone interacting with them. To determine whether this MAb recognizes a cellular protein, uninfected HepG2 cells were radiolabeled and cell lysates were used for immunoprecipitation studies with MAb H14. As shown in Fig. 2, MAb H14 recognized a cellular protein of approximately 70kDa suggesting that HCV glycoprotein aggregates might

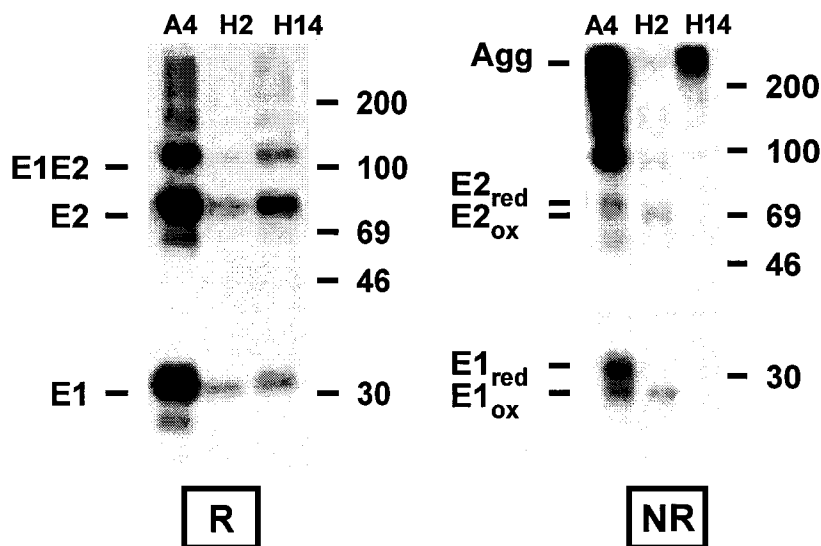


Fig. 1: MAb H14 precipitates aggregates of HCV glycoproteins. HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV170-809. At 4.5 hours post-infection, cells were labeled for 2 hours with [³⁵S] methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with a conformation-insensitive (A4; anti-E1) or -sensitive (H2; anti-E2) MAb, or with MAb H14. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing (R) or nonreducing (NR) conditions. Agg, aggregates; E1red, reduced form of E1; E2red, reduced form of E2; E1ox, oxidized form of E1; E2ox, oxidized form of E2; E1E2, uncleaved form of HCV glycoproteins. HCV-specific proteins are indicated on the left and the sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right

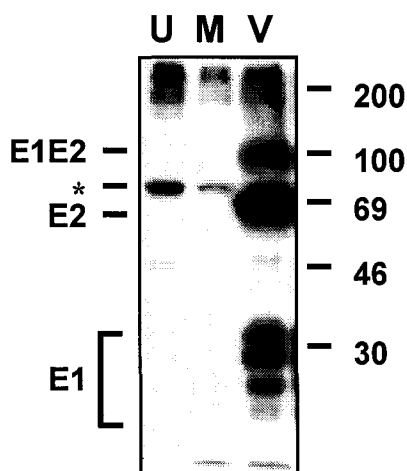


Fig. 2: MAb H14 precipitates a cellular protein (*). HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV170-809 (V), vTF7-3 alone (M), or left uninfected (U). At 4.5 h postinfection, cells were labeled for 2 h with [³⁵S] methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with MAb H14. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) under reducing condition. HCV-specific proteins are indicated on the left and the sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right.

interact with this protein. To identify the cellular protein recognized by MAb H14, internal amino acid sequences of this protein were determined. For this purpose, the 70kDa protein was purified by immunoaffinity and digested with endoproteinase Lys-C to generate peptides. Two internal peptides were purified and sequenced (KSLGWLK and KAAIPSALDT) and they matched with the sequence of a protein called Mac-2 binding protein (M2BP) (Koths *et al.*, 1993, Ulrich *et al.*, 1994).

Recognition of M2BP by MAb H14 was confirmed by immunoprecipitation of cell lysates with MAb H14, followed by Western blotting detection with a polyclonal antibody raised against M2BP (Fig 3A). Similarly M2BP precipitated by the polyclonal antibody was recognized by MAb H14 when analyzed by Western blotting (Fig 3B).

Contrary to our expectations, the protein recognized by MAb H14 is not an ER chaperone. M2BP is a large oligomeric protein composed of 90kDa glycosylated subunits which is secreted as a ring-like structure (Sasaki *et al.*, 1998). When analyzed in pulse-chase experiments with the polyclonal antibody, M2BP appeared as a 70kDa band which increased in intensity during the first hour of chase (Fig. 4A). The intensity of this 70kDa protein started to decrease after 2 h of chase and a band of approximately 90kDa appeared, suggesting that some modifications had occurred. The intensity of the 90kDa band was low and this is probably due to the secretion of M2BP since a similar band was precipitated from the supernatant after a 4-hour chase (Fig. 4A). When analyzed in pulse-chase experiments with MAb H14, the profile of detection of M2BP was very similar for the 70kDa form (Fig. 4A). However, neither the intracellular 90kDa protein nor its secreted form were precipitated by MAb H14, suggesting that the epitope recognized by this MAb is masked by some modification occurring in the secretory pathway. This modification is probably occurring in the Golgi apparatus since the 70kDa form of M2BP was endo H sensitive whereas the 90kDa form was endo H resistant (Fig. 4B). Together, these data indicate that MAb H14 recognizes an immature form of M2BP.

After confirming that MAb H14 recognizes an epitope present on a cellular protein, we wanted to know whether the precipitation of HCV glycoprotein aggregates is due to their interaction with M2BP or whether they share an epitope with this cellular protein. Surprisingly, Western blotting analyses indicated that H14 recognizes both HCV glycoproteins E1 and E2 (Fig.

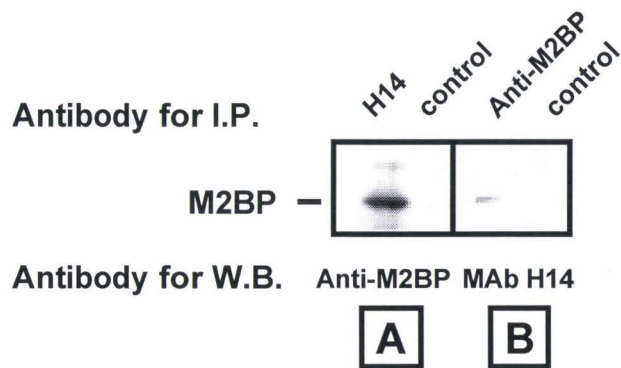


Fig. 3: Western blotting analysis of the cellular protein (M2BP) recognized by MAb H14. (A) HepG2 cell lysates were immunoprecipitated with MAb H14 or an isotype-matched control MAb. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and revealed by Western blotting with a polyclonal antibody to M2BP. (B) HepG2 cell lysates were immunoprecipitated with an anti-M2BP polyclonal antibody or a species-matched control antibody. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and revealed by Western blotting with MAb H14.

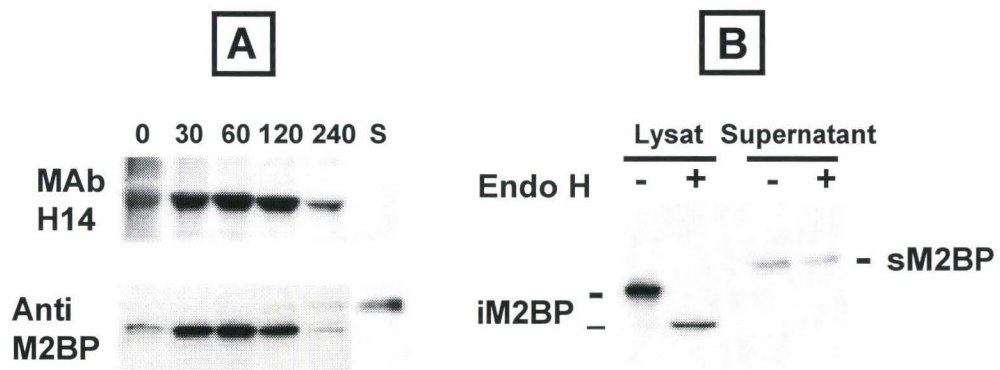


Fig. 4: MAb H14 recognizes the intracellular form of M2BP but not its secreted form. (A) HepG2 cells were pulse-labeled for 5 min with [^{35}S] methionine and chased for the indicated times. Cell lysates and supernatants (S, for the 240 min chase only) were used for immunoprecipitation with MAb H14 or an anti-M2BP polyclonal antibody. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing condition. (B) Analysis of the endo H sensitivity of the intra- and extra-cellular forms of M2BP. Lysates and supernatants of [^{35}S] methionine-labeled HepG2 cells were immunoprecipitated by an anti-M2BP polyclonal antibody and then treated or not with endo H. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing condition. iM2BP, intracellular form of M2BP; sM2BP, secreted form of M2BP.

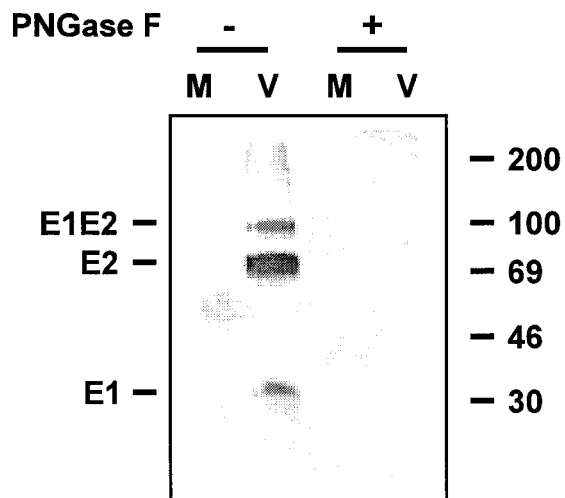


Fig. 5: HCV glycoproteins but not their deglycosylated form are recognized by MAb H14 in Western blotting analysis. Hep G2 cells were coinfectd with vTF7-3 and vHCV170-809 (V) or vTF7-3 alone (M) and lysed with Triton X-100. Cell lysates were immunoprecipitated with MAb A4 and then treated or not with PNGase F. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and revealed by Western blotting with MAb H14. HCV-specific proteins are indicated on the left and the sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right.

5); however, the affinity for E1 was lower. It is worth noting that the deglycosylated forms of HCV glycoproteins were not recognized by H14 (Fig. 5), suggesting that H14 recognizes a glycan structure or that the H14 epitope is stabilized by a glycan. The absence of sequence identity between E1, E2 and M2BP suggests that the H14 epitope might involve, at least, partially a glycan structure which is not accessible on HCV glycoproteins when they are folded.

Together, these data indicate that misfolded HCV glycoproteins, which are aggregated, share an epitope with the immature form of a cellular protein called M2BP.

Characterization of HCV glycoprotein aggregates.

HCV glycoproteins expressed in different cell lines (chick cells, insect cells, BHK-21, CV-1 and HepG2) were precipitated by MAb H14 suggesting that aggregates are formed in these different cell lines (data not shown). In addition, MAb H14 precipitated HCV glycoproteins expressed by viral (vaccinia and Sindbis viruses) or non-viral vectors (data not shown), indicating that the formation of HCV glycoprotein aggregates is not influenced by the expression system.

Since MAb H14 recognizes an epitope on both E1 and E2 (Fig. 5), we wanted to know whether the H14 epitope would be accessible on these proteins expressed alone, in the absence of any denaturation. For this purpose, HCV glycoproteins were analyzed by immunoprecipitation under nondenaturing conditions. As shown in Fig.6, MAb H14 precipitated E1 or E2 when expressed alone, suggesting the H14 epitope is not buried in these glycoproteins. It is worth noting that these proteins were no longer recognized by MAb H14 when deleted at their C-terminus, suggesting that the H14 epitope might be present in close proximity of their transmembrane domain. However, the same truncated forms of E2 were recognized by MAb H14 in Western blotting experiments (data not shown), indicating that the H14 epitope is present on these truncated proteins but is not accessible unless the proteins are denatured. These data suggest that the transmembrane domains of HCV glycoproteins might be indirectly involved in the formation of aggregates.

The kinetics of formation of HCV glycoprotein aggregates were analyzed in pulse-chase experiments. As shown in Fig. 7, HCV glycoprotein aggregates recognized by MAb H14 were

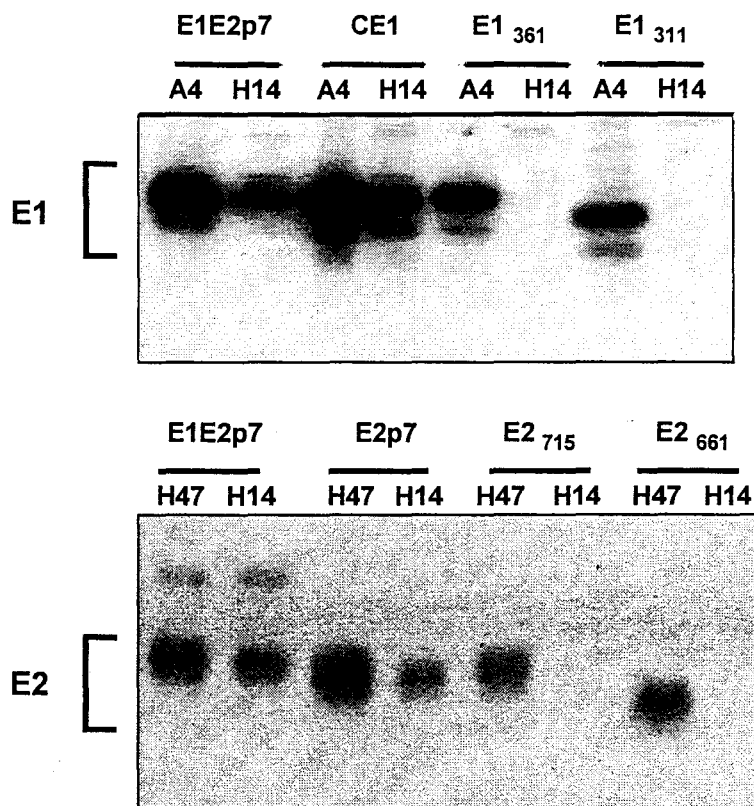


Fig. 6: Immunoprecipitation of full-length and truncated forms of HCV glycoproteins expressed alone. HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant. At 3 h postinfection, cells were labeled for 2 h with [³⁵S] methionine and lysed with Triton X-100. Cell lysates were immunoprecipitated with MAb A4 (detection of E1), H47 (detection of E2) or MAb H14, and then analyzed by SDS-PAGE under reducing condition.

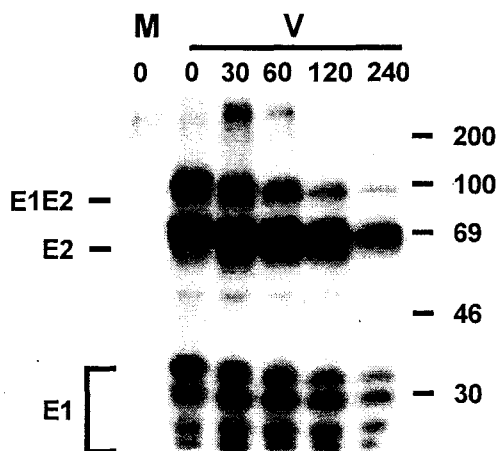


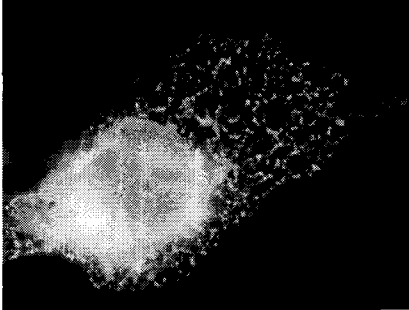
Fig. 7: Kinetics of the detection of HCV glycoproteins by MAb H14. HepG2 cells infected with vTF7-3 and vHCV170-809 (V) or vTF7-3 alone (M) were pulse-labeled for 5 min with [³⁵S] methionine and chased for the indicated times. Cell lysates were immunoprecipitated with MAb H14 and immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) under reducing condition. HCV-specific proteins are indicated on the left and the sizes (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated on the right.

already formed during the pulse and the intensity of HCV glycoproteins precipitated by H14 remained rather stable during the chase. It is worth noting that MAb H14 can precipitate different glycoforms of E1 (Fig. 7). These data suggest that HCV glycoprotein aggregates are formed very rapidly but are very slowly degraded.

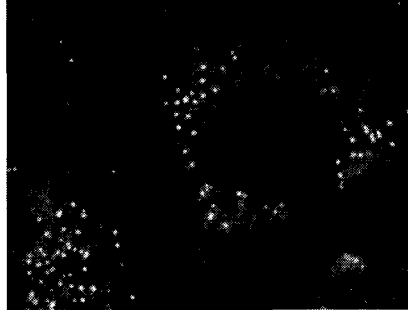
To further characterize HCV glycoprotein aggregates recognized by MAb H14, we analyzed their expression by immunofluorescence. As shown in Fig. 8A, aggregates of HCV glycoproteins were localized in ER-like structures as usually observed for HCV glycoproteins (Dubuisson *et al.*, 1994). However, when compared to the detection with other anti-E1 or anti-E2 MAbs, a smaller number of cells showed a strong ER-like signal with MAb H14 (Fig. 8B). We observed that only approximately 20% of the cells expressing HCV glycoproteins exhibited a strong ER-like signal with MAb H14, suggesting that HCV glycoprotein aggregation occurs in a small proportion of the infected cells. Similar results were observed in HepG2 cells infected by vaccinia virus-HCV recombinants (data not shown). It is worth noting that some fluorescence was also detected in control cells which did not express HCV glycoproteins (Fig. 8A). In these cells, the fluorescence accumulated in some spots which likely represent the subcellular localization of the immature form of M2BP recognized by MAb H14. Since the endo H resistant form of M2BP is not recognized by MAb H14, the compartment stained by immunofluorescence in the control cells is probably a pre-medial Golgi compartment.

A

vHCV170-809 + vTF7.3

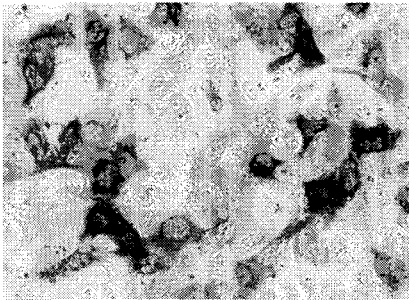


vTF7.3



B

A4



H14

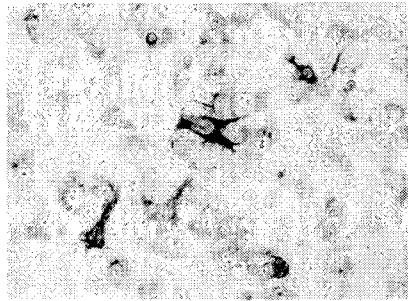


Fig. 8: Immunodetection, by MAb H14, of cells infected by recombinant viruses expressing HCV glycoproteins. (A) CV-1 cells were infected with vTF7-3 and vHCV170-809 (E1E2p7) or vTF7-3 alone. At 8 h postinfection, cells were fixed with isopropanol and labeled with MAb H14 (secondary donkey anti-mouse IgG-Rhodamine). (B) CV-1 cells were infected with a Sindbis virus recombinant expressing a truncated form of HCV polyprotein (SINrep/HCV-H1-1207) at a multiplicity of infection of 0.5. At 8 h postinfection, cells were fixed with isopropanol and labeled with MAb H14 or A4 (secondary rabbit anti-mouse IgG-Alkaline Phosphatase).

DISCUSSION

HCV glycoproteins have a tendency to aggregate and recent data suggest that this tendency to form aggregates is probably an intrinsic property of these proteins (Dubuisson, 1999). To further understand the potential role played by HCV glycoprotein aggregates in HCV infection, we produced a MAb (H14) which specifically recognizes these aggregates but not the noncovalent E1E2 heterodimer. Characterization of HCV glycoprotein aggregates with the help of MAb H14, indicates that these aggregates share an epitope with a cellular protein (M2BP) and are expressed in a small proportion of the infected cells.

Aggregates of HCV glycoproteins share an epitope with M2BP. Viruses are major candidates for the induction of autoimmune diseases. Autoimmunity, in the form of autoantibodies, is common after many viral infections and may well result from the mimicking of host proteins by viral antigens. Hepatitis C virus induces a number of diseases of presumed autoimmune background, like mixed cryoglobulinaemia, glomerulonephritis, panarthritis, arthritis, thyroiditis and skin lesions (Houghton, 1996). On the other hand a number of autoantibodies are observed during the course of hepatitis C (Manns & Obermayer-Straub, 1997). Of particular interest are liver/kidney microsomal (LKM) antibodies. LKM antibodies in chronic hepatitis C recognize several autoepitopes differing from those of autoimmune hepatitis. Hepatitis C-associated LKM antibodies are more heterogeneous. They recognize either conformational or several distinct linear epitopes on cytochrome P450 2D6 (Manns & Obermayer-Straub, 1997). They may also react with other microsomal proteins. Apart from their molecular masses of 59 and 70 kDa these microsomal antigens are not yet identified (Durrazzo *et al.*, 1995). The identification of a common epitope between HCV glycoprotein aggregates and M2BP suggests that M2BP might be a target for autoantibodies. This suggestion is reinforced by the fact that the microsomal form of M2BP is a protein of about 70 kDa and by the observation that among 14 HCV-positive sera tested, one reacted against M2BP (Dubuisson, unpublished data). Future studies should help us to evaluate the prevalence of such autoantibodies in HCV-infected patients.

The epitope recognized by MAb H14 is only present on the immature form of M2BP. Modifications of some glycans seem to abolish the recognition of the epitope suggesting that the secreted form of M2BP is not recognizable by potential autoantibodies directed against the epitope shared with HCV glycoprotein aggregates. Nevertheless, it is conceivable that this modification does not occur in some cell types *in vivo* and therefore that some mature form of M2BP could be recognized by an antibody directed against HCV glycoprotein aggregates. This reactivity could lead to an alteration in M2BP functions. In addition, it could also induce an inflammatory response in the tissue recognized by the antibody. M2BP is a large oligomeric protein composed of 90kDa glycosylated subunits which is secreted as a ring-like structure (Sasaki *et al.*, 1998). It is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which binds to $\beta 1$ integrins, collagens and fibronectin. However, additional functions have been proposed for M2BP. It has been shown to induce lipopolysaccharide-dependent binding to CD14 (Yu & Wright, 1995), enhance the activity of killer cells and interleukin production (Ulrich *et al.*, 1994), suppress some tumor (Jallal *et al.*, 1995) and promote cell aggregation by cross-linking surface-bound galectin-3 (Inohara *et al.*, 1996). M2BP is present in several biological fluids where it may exert its functions. In addition, elevated levels of M2BP can be observed in some cancers as well as some viral infections, including hepatitis C (Artini *et al.*, 1996, Iacobelli *et al.*, 1994, Longo *et al.*, 1993).

HCV glycoprotein aggregates recognized by MAb H14 are expressed in a small proportion of the infected cells. Indeed, a large portion of cells expressing HCV glycoproteins did not show a signal above background when analyzed by immunofluorescence with MAb H14. These data suggest that, in some physiological conditions, aggregates of HCV glycoproteins are less likely to be formed. We can expect that an appropriate concentration of the chaperones and/or foldases involved in HCV glycoprotein folding could reduce the formation of aggregates. Recently, we have identified ER chaperones potentially involved in the folding and assembly of HCV glycoproteins (Choukhi *et al.*, 1998). However overexpression of these chaperones did not improve the folding of these glycoproteins. Since several chaperones can be involved in assisted folding of proteins in the ER, it is likely that a proper balance of chaperone activities is required for optimal folding. It is also likely that other chaperone(s) and/or foldase(s), which have not been identified yet, are necessary to assist in HCV glycoprotein folding. The use of MAb H14

should help us to determine the conditions in which cells produce these aggregates at a lower level.

Why do some protein aggregate *in vivo*? Since protein folding in the cell is so complex, there is a significant likelihood of defects arising in the process. Potentially, thermodynamic destabilization of the native or an intermediate state, alteration of the folding kinetics, prolonged or inappropriate associations with chaperones or foldases, preferential formation of off-pathway or toxic conformations, could all lead to loss of functional protein. Inability of an essential protein to form its native structure under physiological conditions may be the basis of a variety of human diseases (for review: (Thomas *et al.*, 1995)). In the case of HCV glycoproteins, it is hard to prove that, in the course of an HCV infection, aggregates such as those characterized in this work can be formed. This is due to the absence of a tissue culture system which allows an efficient replication of HCV. However, the use of different expression systems (viral or none) to study the assembly of HCV glycoproteins allows us to conclude that aggregation of HCV glycoproteins is not an artifact linked to the expression system. In the context of HCV infection, inefficient folding of the HCV glycoproteins might downregulate particle formation and virus replication to minimize exposure of viral antigens to the immune system and/or reduce pathogenicity. Alternatively, the production of HCV glycoprotein aggregates could provide these glycoproteins with additional functions in infected cells or on the particle. The noncovalent HCV glycoprotein complex previously characterized (Deleersnyder *et al.*, 1997) is most likely the prebudding form of the functional complex which will play an active role in the entry process in infected cells. However, it cannot be excluded that a portion of HCV glycoprotein aggregates are composing the envelope of the mature particle, providing the viral particle with additional functions. More likely, in infected cells, aggregates of HCV glycoproteins could interact with host proteins in the ER compartment whose transport or function could be altered as a consequence of these interactions. Further work will be necessary to evaluate the potential role of HCV glycoprotein aggregates in the physiopathology of HCV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to R. Timpl (Max Planck Institute für Biochemie, Martinsried, Germany), M. Green (St Louis University, St Louis, MO) C.M. Rice (Washington University, St Louis, MO) and B. Bourez (Pasteur Institute of Lille) for the generous gift of antibodies or vaccinia recombinants. We thank Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript and Sophana Ung for excellent technical assistance. This work was supported by the CNRS, the Pasteur Institute of Lille and ARC grant 9736.

REFERENCES

- Artini, M., Natoli, C., Tinari, N., Costanzo, A., Marinelli, R., Balsano, C., Porcari, P., Angelucci, D., D'Egidio, M., Levrero, M. & Iacobelli, S. (1996).** Elevated serum levels of 90K/MAC-2BP predict unresponsiveness to α -interferon therapy in chronic HCV hepatitis patients. *Journal of Hepatology* **25**, 212-217.
- Chamberlain, J. P. (1979).** Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Analytical Biochemistry* **98**, 132-135.
- Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O'Riordan, C. R. & Smith, A. E. (1990).** Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998).** Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in folding of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **72**, 3851-3858.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.-C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1999).** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **73**, 2641-2649.
- Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998).** A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology* **72**, 2183-2191.
- 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.
- Denning, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E. & Welsh, M. J. (1992).** Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764.

- Dobson, C. M. & Ellis, R. J.** (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO Journal* **17**, 5251-5254.
- Dubuisson, J.** (1999). Folding, assembly and subcellular localization of HCV glycoproteins. *Current Topics Microbiology and Immunology*, In press.
- 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.
- Dubuisson, J. & Rice, C. M.** (1996). Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of Virology* **70**, 778-786.
- Durrazzo, M., Philipp, T., Van Pelt, F. N., Luttig, B., Borghesio, E., Michel, G., Schmidt, E., Loges, S., Rizzetto, M. & Manns, M. P.** (1995). Heterogeneity of microsomal autoantibodies (LKM) in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology* **108**, 455-462.
- Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Moradpour, D., Wychowski, C. & Dubuisson, J.** (1998). Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32088-32095.
- Fischer, G. & Schmid, F. X.** (1990). The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* **29**, 2205-2212.
- 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.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B.** (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 8122-8126.

- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M.** (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385-1395.
- Habersetzer, F., Fournillier, A., Dubuisson, J., Rosa, D., Abrigniani, S., Wychowski, C., Nakano, I., Trépo, C., Desgranges, C. & Inchauspé, G.** (1998). Characterization of human monoclonal antibodies specific of the hepatitis C virus glycoprotein E2 with in vitro binding neutralization properties. *Virology* **249**, 32-41.
- Harlow, E. & Lane, D. P.** (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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, Pa: Lippincott-Raven.
- Iacobelli, S., Sismondi, P., Giai, M., D'Egidio, M., Tinari, N., Amatetti, C., DiStefano, P. & Natoli, C.** (1994). Pronostic value of a novel circulating serum 90K antigen in breast cancer. *British Journal of Cancer* **69**, 172-176.
- Inohara, H., Akahani, S., Koths, K. & Raz, A.** (1996). Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Research* **56**, 4530-4534.
- Jallal, B., Powell, J., Zachwieja, J., Brakebusch, C., Germain, L., Jacobs, J., Iacobelli, S. & Ullrich, A.** (1995). Suppression of tumor growth in vivo by local and systemic 90K level increase. *Cancer Research* **55**, 3223-3227.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M.** (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-574.
- Koths, K., Taylor, E., Halenbeck, R., Casipit, C. & Wang, A.** (1993). Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 14245-14249.
- 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.
- Longo, G., Natoli, C., Raffanelli, D., Tinari, N., Marfini, M., Rossi-Ferrini, P., D'Ostilio, N. & Iacobelli, S.** (1993). Pronostic value of a novel circulating serum 90K antigen in HIV-infected haemophilia patients. *British Journal of Haematology* **85**, 207-209.
- Manns, M. P. & Obermayer-Straub, P.** (1997). Viral induction of autoimmunity: mechanisms and examples in hepatology. *Journal of Viral Hepatitis* **4** (suppl. 2), 42-47.
- 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.
- 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.
- Rosenfeld, J., Capdeville, J., Guillemot, J. & Ferrara, P.** (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after 1 or 2 dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **203**, 173-179.
- Sasaki, T., Brakebusch, C., Engel, J. & Timpl, R.** (1998). Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds $\beta 1$ integrins, collagens and fibronectin. *EMBO Journal* **17**, 1606-1613.
- Thomas, P. J., Qu, B.-H. & Pedersen, P. L.** (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 456-459.
- Thomas, P. J., Shebagamurthi, P., Sondek, J., Hullihen, J. M. & Pedersen, P. L.** (1992). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 5727-5730.

- Ulrich, A., Sures, I., D'Egidio, M., Jallal, B., Powell, T. J., Herbst, R., Dreps, A., Azam, M., Rubinstein, M., Natoli, C., Shawver, L. K., Schlessinger, J. & Iacobelli, S.** (1994). The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 18401-18407.
- Yu, B. & Wright, S. D.** (1995). LPS-dependent interaction of Mac-2-binding protein with immobilized CD14. *Journal of Inflammation* **45**, 115-125.

Discussion de l'article « Characterization of Aggregates of Hepatitis C virus Glycoproteins »

I. Introduction

Comme nous l'avons précédemment décrit, l'assemblage des glycoprotéines E1 et E2 du VHC apparaît inefficace et conduit majoritairement à la formation d'agrégats (Deleersnyder, et al. 1997). Ces protéines associées par des ponts disulfures sont probablement des « déchets » pour le virus, car il est peu probable qu'elles entrent dans la composition de l'enveloppe virale. Néanmoins, le fait que l'agrégation des ces glycoprotéines puisse être une propriété intrinsèque du virus, laisse à penser qu'elles pourraient jouer un rôle dans une étape du cycle viral ou dans l'interaction avec la cellule hôte (Dubuisson, 1999, sous presse). Afin de mieux caractériser les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC, nous avons produit un anticorps monoclonal (Ac Mn) qui reconnaît de manière spécifique ces agrégats.

II. Spécificité de reconnaissance par l'Ac Mn H14

A. L'Ac Mn H14 précipite les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC

Nous avons immunisé des souris à l'aide de complexes E1E2 préalablement précipités par un Ac Mn anti-E1, indépendant de la conformation. Parmi les différents hybridomes obtenus, nous avons sélectionné ceux qui produisaient un anticorps capable d'immunoprécipiter spécifiquement les agrégats des glycoprotéines du VHC. En effet, après séparation sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices, les agrégats formés par des protéines liées entre elles par des ponts disulfures ne pénètrent pas ou peu dans le gel de polyacrylamide. Dans ces conditions, nous avons pu montrer que les glycoprotéines précipitées par l'Ac Mn H14 présentaient ce profil de migration caractéristique (Figure 1 de l'article). Ainsi, en absence d'agent réducteur, aucune protéine E1 et/ou E2 sous forme monomérique n'a pu être détectée par l'Ac Mn H14, contrairement aux anticorps monoclonaux H2 (conformationnel-dépendant) et A4 (conformationnel-indépendant). En effet, l'anticorps A4 précipitait également des agrégats en plus des formes monomériques alors que l'anticorps H2 ne précipitait que le complexe E1E2 non-covalent, comme nous l'avons déjà décrit (Deleersnyder, et al. 1997). Ainsi, l'anticorps

H14 semblait donc suffisamment spécifique pour être utilisé dans la caractérisation des agrégats formés par E1 et E2.

B. L'Ac Mn H14 reconnaît une protéine cellulaire

La détection d'une protéine par immunoprécipitation ne veut pas nécessairement dire que cette protéine porte l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé. En effet, l'épitope peut être porté par une autre protéine, avec laquelle elle interagit. Dans le but d'évaluer si l'anticorps H14 pouvait reconnaître ou non une protéine cellulaire, du lysat de cellules non infectées a été utilisé dans des expériences d'immunoprécipitation par l'Ac Mn H14. Comme le montre la figure 2 de l'article, l'immunoprécipitation d'une protéine d'environ 70 kDa par l'Ac Mn H14 suggère que la reconnaissance des agrégats pourrait se faire via une protéine cellulaire.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le paragraphe E. (page 71), les glycoprotéines E1 et E2 interagissent avec des chaperons du RE. Certains chaperons du RE ont une masse moléculaire proche de 70 kDa et pouvaient donc être des candidats potentiels, néanmoins, nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence la coprécipitation de l'un d'entre eux par l'Ac Mn H14 (résultats non montrés). Le séquençage de la protéine s'est donc avéré indispensable à son identification, et nous a permis de montrer qu'il s'agissait de la protéine "Mac-2 binding protein" (M2BP), qui fait partie de la famille des protéines SRCR (scavenger receptor cysteine rich) typiquement retrouvées à la surface de lymphocytes T, et impliquées dans les fonctions de défense immunitaire (Ullrich, et al. 1994, Figure 23). Des preuves supplémentaires ont été apportées par des travaux complémentaires d'immunoprécipitation et de Western-blotting à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-M2BP (Figure 3 de l'article).

M2BP, encore appelée 90K, est une protéine sécrétée qui a pu être observée dans la matrice extracellulaire sous forme d'oligomères en anneaux de 1000 à 1500 kDa (Sasaki, et al. 1998). Les différentes fonctions de cette protéine seront décrites et discutées dans le paragraphe V.2. (page 84).

III. Caractérisation de l'épitope reconnu par l'anticorps H14

A. L'Ac Mn H14 reconnaît un épitope accessible sur la forme immature de M2BP

La comparaison des profils de détection de M2BP immunoprécipité par l'Ac Mn H14 et le sérum anti-M2BP dans des expériences de marquage-chasse, a permis de mettre en évidence deux formes de masses moléculaires respectives 70 et 90kDa (Figure 4A de l'article). La forme

<u>MTPPRLEFWV</u>	<u>LLVAGTOGVN</u>	<u>DGDMRLADGG</u>	<u>ATNOGRVEIF</u>	<u>YRGOWGTVC</u> D	<u>NLWDLTDASV</u>
V <u>CRALGFENA</u>	<u>TOALGRAAFG</u>	<u>OGSGPIMLDE</u>	<u>VO</u> C <u>TGTEASL</u>	<u>AD</u> C <u>KS</u> <u>LGWLK</u>	<u>SN</u> C <u>RHERDAG</u>
<u>VV</u> C <u>TN</u> <u>ETRST</u>	HTLDLSRELS	EALGQIFDSQ	RGCDLSISVN	VQGEDALGFC	GHTVILTANL
EAQALWKEPG	S NVTMSVDAE	CVPMVRDLLR	YFYRRIDIT	LSSVKCFHKL	ASAYGARQLQ
GYCASLFAIL	LPQDPSFQMP	LDLYAYAVAT	GDALLEKLCL	QFLAWNFEAL	TQAEAWPSVP
TDLLQLLLPR	SDLAVPSELA	LLKAVDTSWS	GERASHEEVE	GLVEKIRFPM	MLPEELFELQ
F <u>N</u> LSLYWSHE	ALFQKKTLQA	LEFHTVPFQL	LARYKGL N LT	EDTYKPRIYT	SPTWSAFVTD
SSWSARKSQL	VYQSRRGPLV	KYSSDYFQAP	SDYRYYPYQS	FQTPQHPSFL	FQDKRVSWSL
VYLPTIQSCW	NYGFSCSSDE	LPVLGLTKSG	GSDRTIAYEN	KALMLCEGLF	VADVTD FEGW
<i>KAAIP</i> <i>SALDT</i>	N SSKSTSSFP	CPAGHFNGFR	TVIRPFYLT N	SSGVD	

Figure 23: Séquence en acides aminés de Mac-2 binding protein, d'après Ullrich *et al.*, 1994.

Le peptide signal putatif est en grisé; la région homologue au SRCR (scavenger receptor cystein rich) est soulignée et ses cystéines sont en gras; les sites potentiels de N-glycosylation sont en gras; et les deux peptides internes que nous avons séquencé sont en italique.

de plus haut poids moléculaire ne semble pas immunoprécipitée par l'anticorps H14. De plus, lors de l'immunoprécipitation par l'anticorps polyclonal M2BP, cette forme de 90kDa apparaît parallèlement à la disparition progressive de la forme de 70 kDa (dès 2 heures de chasse), et se retrouve ensuite dans le surnageant de culture cellulaire. Sa résistance à l'endo H indique qu'elle a subi des modifications au niveau de ses glycanes par des enzymes golgiens, lors de la traversée de la voie de sécrétion (Fig.4B de l'article). Ainsi, ces résultats indiquent que l'anticorps H14 reconnaît uniquement la forme immature intracellulaire de M2BP dont la localisation ne dépasse probablement pas le *cis*-Golgi.

B. L'épitope reconnu par l'Ac Mn H14 est présent sur les agrégats des glycoprotéines du VHC

1. Nature de l'épitope reconnu sur les agrégats

Dans un premier temps, nous avons supposé que les glycoprotéines du VHC pouvaient être associées à la protéine cellulaire M2BP reconnue par l'anticorps H14. Cependant, nous avons montré par la suite que l'anticorps H14 reconnaît également les glycoprotéines E1 et E2 en Western-blotting (Figure 5 de l'article), suggérant la présence d'un épitope partagé entre M2BP et ces deux protéines.

L'analyse des séquences en acides aminés des protéines E1, E2 et M2BP n'a pas permis de mettre en évidence de séquence peptidique commune entre ces trois protéines. Cependant, l'absence de détection suite au traitement par la PNGase F suggère que la structure de l'épitope dépend de la présence d'un glycanne ou bien que l'anticorps H14 reconnaît un glycanne (Figure 5 de l'article).

2. Rôle des domaines transmembranaires des glycoprotéines du VHC dans la formation de l'épitope H14

Dans le but de localiser l'épitope reconnu par l'Ac Mn H14 sur les glycoprotéines E1 et E2, nous avons entrepris de les exprimer seules, en totalité ou sous forme tronquée (Figure 6 de l'article). En conditions non dénaturantes, l'anticorps H14 ne semble pas précipiter les formes tronquées de E1 et de E2, suggérant que les domaines transmembranaires de ces protéines sont impliqués dans l'épitope reconnu par l'anticorps H14, ou encore que l'état repliement de ces formes tronquées ne permettrait pas l'exposition de cet épitope à la surface de ces protéines. Cependant, la reconnaissance de ces protéines tronquées en Western-blotting (résultat non montré) semble indiquer que l'épitope se situe au niveau des ectodomaines des glycoprotéines

du VHC, et que les domaines transmembranaires auraient plutôt un rôle dans la stabilisation de l'épitope.

Nous avons déjà montré dans notre laboratoire que la glycoprotéine E1 ou sa forme tronquée E1₃₁₁ exprimée seule est incapable de se replier correctement (Michalak, et al. 1997). Par conséquent, le fait que l'anticorps H14 ne précipite pas nos formes tronquées de E1 (E1₃₆₁ et E1₃₁₁), indique que l'état conformationnel de ces protéines est différent de celui qui existe dans les agrégats formés par les glycoprotéines E1 et E2 liées par des ponts disulfures.

De plus, ces mêmes travaux ont aussi mis en évidence que la forme tronquée E2₆₆₁ est correctement repliée, car elle est reconnue par l'anticorps H2 dépendant de la conformation. Ce résultat expliquerait pourquoi cette protéine E2₆₆₁ alors proche de l'état natif n'est pas reconnue par Mab H14. Comme la forme E2₇₁₅ n'est précipitée ni par l'anticorps H2 ni par l'anticorps H14, son repliement apparaît donc différent de celui qui existe dans les agrégats ou les complexes non-covalents formés par les glycoprotéines du VHC. Ces résultats suggèrent un état de repliement spécifique des glycoprotéines E1 et E2 engagées dans la formation d'agrégats, et indique que les domaines transmembranaires de ces glycoprotéines jouent un rôle important dans la formation de ces agrégats.

3. Cinétique d'apparition et de dégradation des agrégats

Les agrégats se forment très tôt après la synthèse des glycoprotéines virales E1 et E2 (Figure 7 de l'article). Leur temps de demi-vie semble assez long (> 4h), suggérant qu'ils sont soumis à une très lente dégradation dans la cellule. La précocité d'apparition de ces glycoprotéines mal repliées ainsi que leur résistance à la dégradation laisse à penser qu'elles pourraient avoir une fonction dans le cycle infectieux du VHC.

IV. Localisation et répartition des agrégats dans les cellules infectées

Comme cela a déjà été montré dans le laboratoire, les glycoprotéines du VHC exprimées à l'aide de systèmes hétérologues résident au niveau du RE (Dubuisson, et al. 1994, Duvet, et al. 1998). Nous avons pu mettre en évidence une localisation identique des agrégats formés par les glycoprotéines E1 et E2 à l'aide de l'AC Mn H14, révélé en immunofluorescence (Figure 8A de l'article). Cependant, il apparaît que seulement 20% des cellules infectées étaient clairement détectées dans ces conditions d'expérience, ce qui suggère que certaines cellules produisent beaucoup plus d'agrégats que d'autres (Figure 8B de l'article). Ceci pourrait s'expliquer par des différences dans l'état physiologique des cellules infectées. Nous avons montré que certains chaperons moléculaires sont impliqués dans le repliement et l'assemblage des glycoprotéines du

VHC (article I). Ainsi, il se peut que la présence d'une quantité appropriée de ces chaperons (ainsi que d'autres non encore identifiés) suffise à limiter la formation d'agrégats. L'utilisation de l'anticorps H14 nous permettra, par la suite, de déterminer les conditions dans lesquelles les cellules produisent de faibles taux d'agrégats.

Enfin, il est à noter qu'un signal faible et localisé est détecté au niveau des cellules contrôles qui n'expriment pas des glycoprotéines du VHC (Figure 8A de l'article, vTF7.3). Il s'agit très probablement de la détection de la forme immature de M2BP, présente au niveau du compartiment pré-médian du Golgi.

V. Le rôle potentiel des agrégats lors de l'infection par le VHC

1. Rôle potentiel des agrégats dans les maladies autoimmunes associées au VHC

Certaines maladies autoimmunes ont été décrites en association avec une infection par le VHC, telles que la cryoglobulinémie, l'arthrite, ou encore le dysfonctionnement de la glande thyroïde (Houghton 1996). Tout au long de l'infection chronique par le VHC, il a aussi été observé l'apparition d'un certain nombre d'auto-anticorps hétérogènes dirigés contre diverses protéines cellulaires. Parmi eux, des anticorps dirigés contre les protéines microsomales de rein et de foie (LKM antibodies= liver/kidney microsomal antibodies) sont particulièrement intéressants (Manns and Obermayer-Straub 1997). En effet, l'une des protéines reconnue par l'un de ces anticorps possède une masse moléculaire de 70kDa (Durazzo, et al. 1995) et pourrait correspondre à la forme microsomale de M2BP. Il s'avère de plus que parmi 14 séra provenant de patients infectés par le VHC, un sérum a permis la détection de M2BP en immunoprécipitation (Dubuisson, résultat non montré).

2. Rôle potentiel d'anticorps anti-agrégats dans l'inhibition fonctionnelle de M2BP

En plus d'une réponse inflammatoire des tissus, la présence d'anticorps dirigés contre M2BP pourrait avoir une incidence sur les différentes fonctions biologiques de cette protéine, à condition que certaines formes sécrétées de cette protéine soient reconnues par des auto-anticorps. Nos résultats montrent que l'épitope partagé entre M2BP et les agrégats formés par les glycoprotéines E1 et E2 n'est présent que sur la forme intracellulaire de M2BP (III.A., page 81). De plus, la reconnaissance de cet épitope semble liée à la présence d'une structure glycanique (III.B.1., page 82), qui devrait être de nature oligomannosidique, comme il a été

montré pour les glycoprotéines du VHC (Duvet, et al. 1998). Il est cependant possible que certains glycanes de M2BP (de type complexes sur la forme mûre) ne soient pas modifiés dans certains types cellulaires, et que des anticorps dirigés contre l'épitope H14 puissent moduler la fonction de cette protéine.

Plusieurs rôles ont été proposés pour la protéine M2BP. De nombreux travaux ont montré que M2BP intervient d'une part, au niveau de l'adhésion cellulaire, et d'autre part, au niveau de la stimulation de la réponse immunitaire. Cette protéine qui a aussi été détectée dans de nombreux fluides biologiques apparaît posséder un large champ d'action.

M2BP a été mise en évidence en association aux intégrines β_1 , aux collagènes et à la fibronectine de la matrice extracellulaire (Sasaki, et al. 1998). De plus, il a été montré que l'adhésion des cellules tumorales à la laminine se faisait par l'intermédiaire de la lectine β -galactoside-spécifique MAC-2 (encore appelée galectine-3). Il s'avère que MAC-2 lie spécifiquement les glycanes complexes de M2BP qui possèdent donc un motif lactose ou galactose (Inohara, et al. 1996). À la lumière de ces données, il apparaît donc évident qu'un dysfonctionnement de M2BP, dû à sa reconnaissance par l'anticorps H14, pourrait conduire à une perturbation de l'adhérence cellulaire.

Les travaux de l'équipe de Iacobelli ont montré un rôle potentiel de M2BP dans la stimulation de l'activité des cellules NK (natural killer) et LAK (lymphokine-activated killer) via l'induction de la sécrétion de l'interleukine-2 (Ullrich, et al. 1994). De façon caractéristique, il a été observé une augmentation de l'expression de M2BP en réponse à différents cancers ou suite à l'intrusion d'un agent pathogène (virus, bactérie) dans l'organisme. Ainsi, par l'intermédiaire d'un test ELISA, Iacobelli et coll. ont mis en évidence un taux élevé de cette protéine dans les séras de patients atteints de cancer (Iacobelli, et al. 1993). Leurs observations ainsi que celles d'autres laboratoires suggèrent que le maintien d'une production élevée de cette protéine par une tumeur cancéreuse est corrélé avec un diagnostic clinique plus favorable.

Plus récemment, le groupe de Iacobelli a montré que dans le cas d'infections virales chroniques par le VIH, le VHB ou le VHC, le taux sérique de M2BP pouvait être corrélé avec l'évolution clinique de la maladie. En effet, Tinari et coll. ont constaté un arrêt de la diminution de la quantité de lymphocytes CD4 chez des personnes infectées par le VIH présentant un haut taux de M2BP dans le sang (Tinari, et al. 1998). Dans le cas de l'hépatite C chronique, Artini et coll. ont montré une corrélation entre le taux de M2BP et le degré de sévérité de la maladie, ainsi que la durée de l'infection (Artini, et al. 1996). L'ensemble de ces travaux suggèrent que M2BP pourrait jouer un rôle important dans la stimulation du système immunitaire, et que le dysfonctionnement de cette protéine pourrait avoir des répercussions sur les défenses de l'organisme vis à vis d'un agent infectieux comme le VHC.

VI. Conclusion

Les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC possèdent un épitope commun avec la protéine cellulaire M2BP, spécifiquement reconnu par notre anticorps monoclonal H14. Dans le contexte du VHC, il apparaît que les agrégats joueraient un rôle dans la physiopathologie de l'infection par ce virus. Ceci reste encore à démontrer, même si l'hypothèse d'une minimisation de l'exposition d'antigènes viraux au système immunitaire et/ou d'une réduction de la pathogénicité semble probable. En outre, on ne peut pas exclure qu'une portion de ces complexes covalents soit retrouvée au niveau de l'enveloppe de la particule virale mûre. Dans ce cas, les agrégats permettraient au virus d'exercer des fonctions particulières. Avant d'évaluer le rôle potentiel des agrégats des glycoprotéines du VHC dans le cycle viral, il serait cependant nécessaire de définir en détails les étapes limitantes du repliement des glycoprotéines qui seraient à l'origine de leur formation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude de l'assemblage de protéines d'enveloppes virales dans des systèmes d'expression hétérologues a été abondamment développée pour un bon nombre de systèmes viraux. Ces études ont montré, dans de nombreux cas, des résultats similaires à ceux obtenus dans des travaux réalisés avec le virus d'origine. Dans le cas du virus de l'hépatite C, cette étude comparative est malheureusement impossible à réaliser car ce virus ne se multiplie pas de façon efficace en culture cellulaire. Nous sommes donc obligés de supposer que cette comparaison peut également s'appliquer potentiellement au VHC.

Dans des conditions d'expression hétérologue des glycoprotéines du VHC à l'aide de vecteurs viraux, il a été montré que la glycoprotéine E2 interagit avec la glycoprotéine E1 pour former des complexes. Une caractérisation de l'assemblage de ces protéines a montré qu'en présence de détergents non-ioniques deux types de complexes sont formés: un hétérodimère de E1 et E2 stabilisé par des interactions non covalentes et des agrégats hétérogènes contenant des ponts disulfures intermoléculaires (Dubuisson, et al. 1994, Dubuisson and Rice 1996). Une étude plus récente a montré que les hétérodimères non covalents sont composés de protéines bien repliées alors que les agrégats sont formés de protéines mal repliées (Deleersnyder, et al. 1997). Cependant, la présence d'agrégats ne semble pas due à des mutations introduites durant la synthèse de l'ADNc ou à des amplifications par PCR du clone d'origine utilisé dans nos expériences. En effet, la formation d'agrégats a également été observée pour des glycoprotéines dont la séquence était identique à celle d'un clone infectieux récemment caractérisé (Kolykhalov, et al. 1997, Dubuisson and Rice, résultats non publiés). Cette tendance à l'agrégation observée pour les glycoprotéines du VHC pourrait aussi être due aux très hauts niveaux d'expression de ces glycoprotéines dans nos systèmes d'expression, ou à des effets indésirables du vecteur lui-même. Néanmoins, la présence d'agrégats a également été observée dans le cas où les protéines sont exprimées à partir d'un système d'expression non viral, pour lequel les niveaux d'expression sont cependant plus faibles (Duvet, et al. 1998). Ces résultats suggèrent que cette tendance à l'agrégation pourrait être une propriété intrinsèque des glycoprotéines du VHC. Le lent repliement des glycoprotéines du VHC pourrait en effet accroître la fraction protéique déviée vers des voies non-productives de repliement telles que l'agrégation et la formation anormale de ponts disulfures (Fischer and Schmid 1990). Enfin, nous émettons l'hypothèse que cette inefficacité de repliement pourrait avoir lieu au niveau des cellules de patients infectées par le VHC.

Dans ce travail, nous avons identifié des chaperons moléculaires impliqués dans la formation des complexes E1E2, et ce afin de comprendre l'inefficacité d'assemblage des glycoprotéines du VHC. Nous avons également surexprimés ces chaperons dans le but d'améliorer l'efficacité de repliement de ces protéines. Enfin, nous avons caractérisé les agrégats

formés par les glycoprotéines du VHC dans le but ultérieur de comprendre leur rôle potentiel dans la pathogenèse liée du VHC.

L'étude de l'interaction entre les glycoprotéines du VHC et certains chaperons du RE nous a permis de montrer une association prolongée entre ces glycoprotéines et les chaperons CNX, CRT et BiP. La caractérisation de l'interaction des glycoprotéines du VHC avec les protéines BiP et CRT a montré que ces chaperons s'associent essentiellement avec des agrégats formés par les glycoprotéines E1 et E2. Ceci suggère que les glycoprotéines associées à ces chaperons sont engagées dans une voie non productive de repliement (Figure 24). Nous avons aussi pu montrer que la CNX interagit préférentiellement avec des complexes non covalents (Figure 24). Durant leur repliement, les protéines qui composent le complexe natif ont donc probablement été en contact avec la CNX. En effet, ce chaperon interagit avec les glycoprotéines E1 et E2 associées de façon non covalente, et ces dernières acquièrent un état oxydé en sa présence (Dubuisson and Rice 1996). Sur la base de nos résultats ainsi que d'autres données obtenues dans notre laboratoire, nous proposons un premier modèle expliquant certaines étapes de la formation du complexe E1E2 natif (Figure 25). Ainsi, immédiatement après leur synthèse, les formes monomériques de E1 et E2 interagissent avec la CNX. Les ponts disulfures intramoléculaires se forment rapidement pour E2, ce qui conduit à la formation d'au moins un sous-domaine. Cette forme partiellement repliée de E2 peut alors interagir avec la forme non oxydée de E1, ce qui conduit à la formation de complexes glycoprotéiques intermédiaires qui sont associés à la CNX. Le repliement de E1 se déroule alors dans le contexte de ces complexes intermédiaires. Finalement, les glycoprotéines E1 et E2 atteignent leur stade final de repliement, ce qui conduit à la formation d'un complexe E1E2 natif qui se détache de la CNX.

Le rôle majeur des chaperons est d'aider les protéines à atteindre leur conformation native en limitant les interactions non productives. Etant donné qu'une fraction importante des glycoprotéines du VHC forme des agrégats, il est possible que dans les conditions physiologiques, du fait la lenteur de repliement, les chaperons du RE ne puissent jouer pleinement leur fonction. Bien que les chaperons soient abondants dans le RE, une majorité de ces molécules pourrait de plus être impliquée dans des interactions protéine-protéine. Par conséquent, seule une fraction de ces chaperons serait disponible pour engager des interactions avec des protéines néosynthétisées. Afin de suppléer les cellules exprimant les chaperons potentiellement impliqués dans le repliement des glycoprotéines du VHC, ceux-ci ont été surexprimés. Cependant, la surexpression des chaperons CNX, CRT et BiP dans des cellules exprimant les glycoprotéines du VHC n'a pas permis d'améliorer la formation de complexes E1E2 natifs. Ces résultats suggèrent qu'un équilibre entre l'activité des différents chaperons impliqués serait nécessaire pour un repliement optimal. Il est également probable que d'autres chaperon(s) ou foldase(s) non encore identifiés dans ce travail soient nécessaires pour aider au repliement correct de E1 et E2.

La caractérisation des agrégats formés par les glycoprotéines du VHC a pu se faire grâce à l'obtention d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre ces agrégats. L'utilisation

Figure 24: Les différentes étapes de repliement et d'assemblage des glycoprotéines du VHC en complexes, (Dubuisson et al., 1994, Dubuisson et Rice, 1996, Deelersnyder et al., 1997, Michalak et al., 1997, Choukhi et al., 1998).

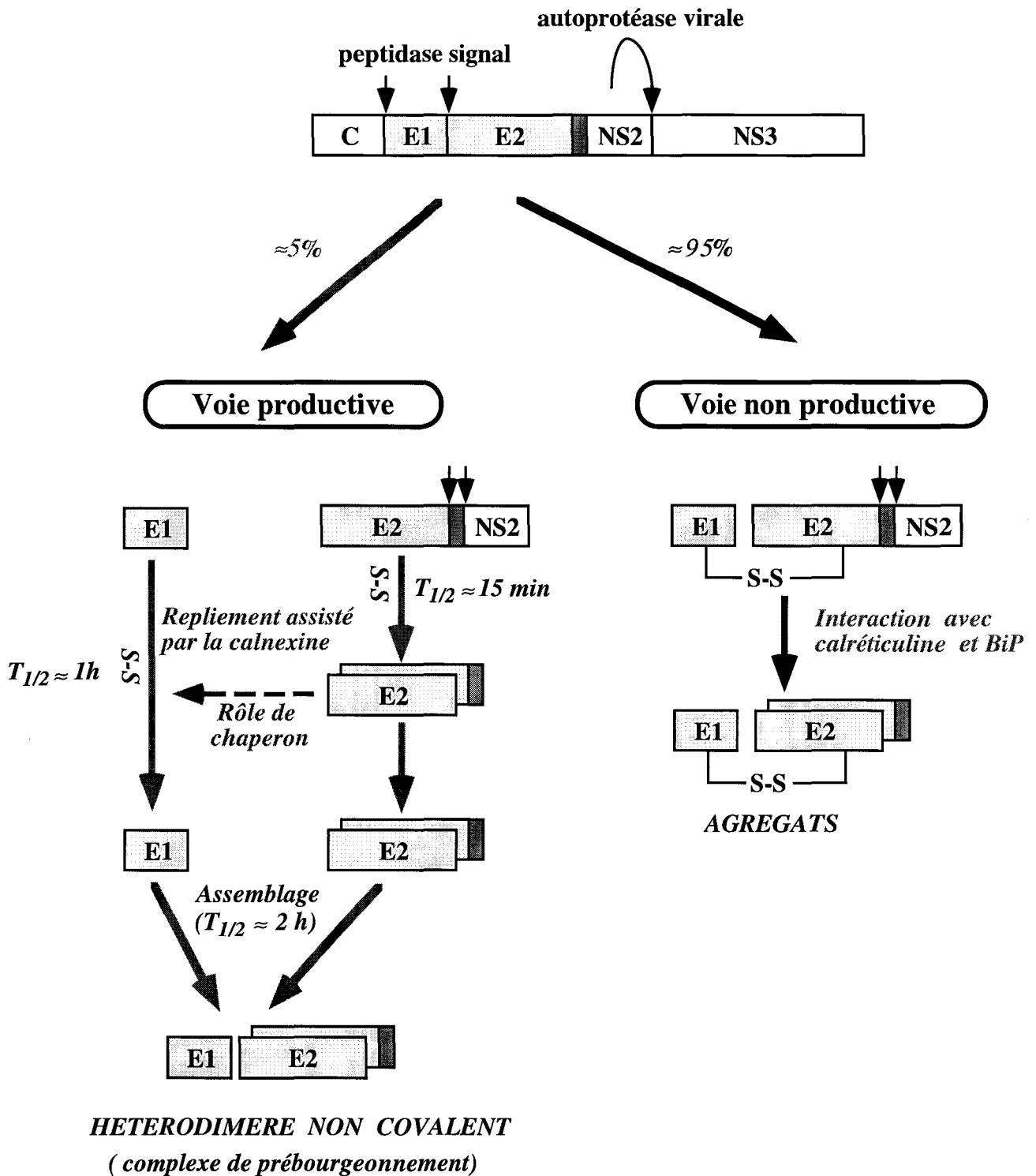
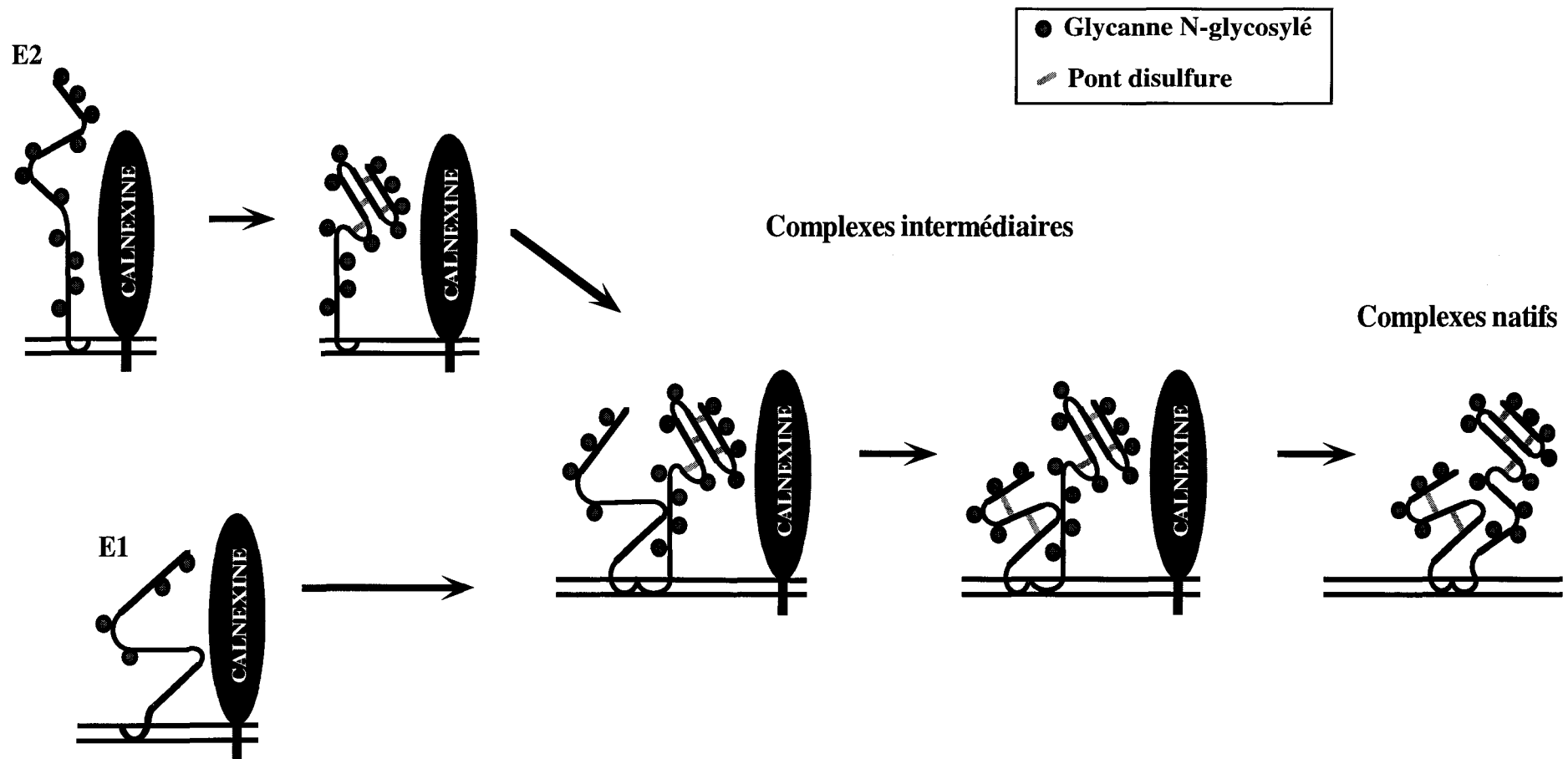


Figure 25: Modèle du repliement des glycoprotéines du VHC. Les glycoprotéines E1 et E2 interagissent individuellement avec la CNX. La forme partiellement repliée de E2 s'associe avec la forme non oxydée de E1 en complexe glycoprotéique intermédiaire. Les glycoprotéines E1 et E2 atteignent leur stade de repliement final (complexe natif) qui se détache de la CNX. D'après Dubuisson, 1999.



de ce nouvel outil nous a permis de montrer que ces agrégats se forment rapidement après la synthèse des glycoprotéines E1 et E2 et qu'ils ne se dégradent que très lentement dans les cellules qui les expriment. Nous avons également observé que toutes les cellules exprimant les glycoprotéines E1 et E2 ne produisaient pas forcément des agrégats en quantité détectable. Ces variations dans l'expression de ces agrégats pourraient être liées à l'état physiologique des cellules qui varie au cours du cycle cellulaire. Enfin, de façon inattendue, nous avons observé la reconnaissance d'un épitope commun entre les agrégats formés par les glycoprotéines du VHC et la protéine cellulaire M2BP, par notre anticorps monoclonal. Ceci suggère que les agrégats formés de E1 et E2 potentiellement produits chez des personnes infectées par le VHC pourraient conduire à la production d'autoanticorps. Dans la poursuite de ce travail, il serait intéressant d'évaluer la production d'anticorps anti-M2BP chez un grand nombre de patients infectés par le VHC afin de confirmer la production d'autoanticorps contre cette protéine, et d'évaluer le rôle potentiel de tels anticorps dans la pathogénèse de l'infection par le VHC.

L'hépatite C représente un problème majeur de santé publique et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de vaccin pour lutter contre cette infection. Les thérapies utilisées actuellement ne sont pas efficaces à 100%, et elle sont longues, coûteuses et non dépourvues d'effets secondaires. Le développement d'un vaccins préventif ou thérapeutique se justifie donc pleinement. Un des buts, à long terme, de l'étude du repliement et de l'assemblage des glycoprotéines du VHC est de pouvoir améliorer l'efficacité de repliement du complexe E1E2 natif qui est un candidat vaccinal potentiel. En effet, Choo et coll. ont immunisé des chimpanzés à l'aide des glycoprotéines E1 et E2 copurifiées à partir de cellules HeLa infectées par un recombinant du virus de la vaccine, exprimant les glycoprotéines du VHC (Choo, et al. 1994). Parmi sept animaux immunisés, cinq d'entre eux ont montré une protection humorale complète contre la souche homologue du VHC qui leur a ensuite été injectée. Cependant, l'efficacité d'une réponse immune humorale protectrice nécessite la prise en compte de la présentation des antigènes (E1E2) dans une conformation native la plus proche de celle observée à la surface des virions.

Dans ce travail, nous avons progressé dans nos connaissances sur l'assemblage du complexe E1E2 natif. La surexpression de chaperons ne nous a malheureusement pas permis d'améliorer l'efficacité d'assemblage de ce complexe. Cependant, l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant ces complexes natifs ou les agrégats devrait nous permettre de trouver les conditions permettant d'obtenir une efficacité optimale dans le repliement et l'assemblage des glycoprotéines en complexe mûre. Différentes lignées cellulaires devront être utilisées pour cette étude, car des résultats préliminaires nous suggèrent une influence du type cellulaire utilisé sur la formation de ce complexe. Enfin, comme nous l'avons déjà mentionné, il faudra aussi tenir compte de l'état physiologique des cellules, qui semble jouer un rôle non négligeable sur le repliement des glycoprotéines du VHC.

Le complexe natif identifié dans notre laboratoire représente probablement la forme de "prébourgeonnement" viral du complexe glycoprotéique. Cependant, il est maintenant établi que ce complexe glycoprotéique d'enveloppe est susceptible de subir des modifications au cours du cycle viral. Ainsi, chez les flavivirus, les particules immatures présentes dans des vésicules dérivées du RE ont une enveloppe contenant l'hétérodimère prME, analogue à E1E2 du VHC (pour revue, Rice 1996). Lors de sa traversée de la voie de sécrétion, la protéine prM subit un clivage par une furine localisée au niveau du *trans*-Golgi (Stadler, et al. 1997). Les particules relarguées à l'extérieur de la cellule possèdent alors à leur surface un homodimère de E. Enfin, lorsque le virus pénètre dans sa cellule hôte, l'acidification de la vésicule d'endocytose provoque la trimérisation de la protéine d'enveloppe (Allison, et al. 1995). Ce processus de maturation du complexe glycoprotéique d'enveloppe pourrait potentiellement exister chez le VHC. Le complexe E1E2 que nous avons identifié n'offre donc qu'une image incomplète des différentes conformations du complexe natif, présentes au cours du cycle viral. De la même manière que pour les flavivirus, des études plus approfondies seront nécessaires pour caractériser le complexe d'enveloppe du virus lors des différentes étapes de l'infection par le VHC.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abeijon, C., and C. B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **17**:32-36.
- Akatsuka, T., M. Donets, L. Scaglione, W. M. Ching, J. W. Shih, A. M. Di Bisceglie, and S. M. Feinstone. 1993. B-cell epitopes on the hepatitis C virus nucleocapsid protein determined by human monospecific antibodies. *Hepatology*. **18**:503-510.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* **69**(10):6367-6375.
- Allain, F., A. Denys, and G. Spik. 1994. Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on human tumor T-cell line. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(24):16537-16540.
- 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**:939-944.
- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. **181**(96):223-230.
- Arber, S., K. H. Krause, and P. Caroni. 1992. s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell. Biol.* **116**(1):113-125.
- Artini, M., C. Natoli, N. Tinari, A. Costanzo, R. Marinelli, C. Balsano, P. Porcari, D. Angelucci, M. D'Egidio, M. Levrero, and S. Iacobelli. 1996. Elevated serum levels of 90K/MAC-2 BP predict unresponsiveness to alpha-interferon therapy in chronic HCV hepatitis patients. *J. Hepatol.* **25**(2):212-217.
- 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.
- Ballardini, G., P. Groff, P. Pontisso, F. Giostra, R. Francesconi, M. Lenzi, D. Zauli, A. Albeti, and F. B. Bianchi. 1995. Hepatitis C virus (HCV) genotype, tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A, B, C, and intercellular adhesion-1 molecules. *Journal of Clinical Investigation*. **95**:2067-2075.
- 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 cyclosporin-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. USA*. **94**:1200-1205.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-laake, 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**:367-373.
- Bass, J., G. Chiu, Y. Argon, and D. F. Steiner. 1998. Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *The Journal of Cell Biology.* **141**(3):637-646.
- Behrens, S.-E., L. Tomei, and R. De Francesco. 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO Journal.* **15**:12-22.
- Bennett, C. F., J. M. Balcarek, A. Varrichio, and S. T. Crooke. 1988. Molecular cloning and complete amino-acid sequence of form-1 phosphoinositide-specific phospholipase C. *Nature.* **334**:268-270.
- 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.
- Bibi, E. 1998. The role of the ribosome-translation and assembly of polytopic membrane proteins. *TIBS.* **23**:51-55.
- Block, T. M., X. Lu, F. M. Platt, G. R. Foster, W. H. Gerlich, B. S. Blumberg, and R. A. Dwek. 1994. Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**(6):2235-2239.
- Blond-Elguindi, S., A. M. Fourie, J. F. Sambrook, and M.-J. H. Gething. 1993. Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J. Biol. Chem.* **268**:12730-12735.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Vinish. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *Journal of American Medical Association.* **191**:541-546.
- Bole, D. G., L. M. Hendershot, and J. F. Kearney. 1986. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J. Cell. Biol.* **102**:1558-1566.
- Bonifacio, J. S. 1996. Reversal of fortune for nascent proteins. *Nature.* **384**:405-406.
- Botarelli, P., M. R. Brunetto, M. A. Minutello, P. Calvo, D. Unutmaz, A. J. Weiner, Q.-L. Choo, J. R. Shuster, G. Kuo, F. Bonino, and e. al. 1993. T-lymphocytes response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology.* **104**:580-587.
- 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.
- Braakman, I., H. Hoover-Litty, K. R. Wagner, and A. Helenius. 1991. Folding of Influenza Hemagglutinin in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology.* **114**(3):401-411.
- 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.
- Bram, R. J., and G. R. Crabtree. 1994. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature.* **371**:355-358.

- Bréchet, C., and D. Kremsdorf. 1993. Genetic variation of the hepatitis C virus (HCV) genome: random events or a clinically relevant issue? *J. Hepatol.* **17**(3):265-268.
- Brewer, J. W., J. L. Cleveland, and L. M. Hendershot. 1997. A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. *The EMBO Journal.* **16**(23):7207-7216.
- Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse, and A. A. McCracken. 1999. The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* **274**(6):3453-3460.
- Brown, E. A., H. 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 Acid Research.* **20**:5041-5045.
- Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1992b. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:187-191.
- Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1992a. Sequence analysis of the 5' noncoding region of Hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:4942-4946.
- Bukh, J., P. Wantzin, K. Krogsgaard, F. Knudsen, R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1993a. 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. *Journal of Infectious Diseases.* **168**:1343-1348.
- Bush, K. T., A. L. Goldberg, and S. K. Nigam. 1997. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **272**:9086-9092.
- Cahour, A. 1995. Les perspectives d'un vaccin contre l'hépatite C: quelle stratégie adopter? *médecine/sciences.* **11**:81-91.
- Cahour, A. 1998. La nécessité d'un vaccin contre l'hépatite C: espoirs et difficultés. *Virologie.* n° spécial, août 1998.
- Cai, H., C. Wang, and C. Tsou. 1994. Chaperone-like activity of Protein Disulfide Isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry.* **269**:24550-24552.
- Campbell, K. P., D. H. MacLennan, and A. O. Jorgensen. 1983. Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J. Biol. Chem.* **258**(18):11267-11273.
- Cannon, K. S., D. N. Hebert, and A. Helenius. 1996. Glycan-dependent and-independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. *The Journal of Biological Chemistry.* **271**(24):14280-14284.
- 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**:996-998.
- 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.
- Chamberlain, R. W., N. Adams, A. A. Saeed, P. Simmonds, and R. M. Elliott. 1997. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J. Gen. Virol.* **78**.
- Chan, S. W., F. McOmish, E. C. Holmes, B. Dow, J. F. Peutherer, E. Follett, P. L. Yap, and P. Simmonds. 1992. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J. Gen. Virol.* **73**:1131-41.
- 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**:91-96.

- Chayama, K., A. Tsubota, Y. Arase, S. Saitoh, I. Koida, K. Ikeda, T. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Iwasaki, S. Koyama, and e. al. 1993. Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8(2):150-156.
- Chemello, L., L. Cavalletto, C. Donada, P. Bonetti, P. Casarin, F. Urban, E. Bernardinello, P. Pontisso, and A. Alberti. 1997. Efficiency of a second cycle of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 113:1654-1659.
- 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.
- Chen, W., J. Helenius, I. Braakman, and A. Helenius. 1995. Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6229-6233.
- Chen, Y., F. Le Caherec, and S. L. Chuck. 1998. Calnexin and other factors that alter translocation affect the rapid binding of ubiquitin to apoB in the Sec61 complex. *J. Biol. Chem.* 273(19):11887-1894.
- Chen, Z., I. Berkower, C. W.M., R. Y. Wang, H. J. Alter, and J. W. Shih. 1996. Identification of a murine CD4+ T-lymphocyte response site in hepatitis C virus core protein. *Mol. Immunol.* 33:703-709.
- Chivers, P. T., M. C. A. Laboissière, and R. T. Raines. 1996. The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *The EMBO Journal.* 15(11):2659-2667.
- 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. USA.* 88:2451-2455.
- Chu, C. M., and Y. F. Liaw. 1993. Coexpression of intercellular adhesion molecule-1 and class I major histocompatibility complex antigens on hepatocyte membrane in chronic viral hepatitis. *J. Clin. Pathol.* 46:1004-1008.
- Chung, A., and S. A. Older. 1997a. Interferon-alpha associated arthritis. *J. Rheumatol.* 24:1844-1845.
- Cocquerel, L., S. Duvet, J.-C. Meunier, A. Pillez, R. Cacan, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1999. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 73(4):2641-2649.
- 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.
- Collins, P. L., and G. Mottet. 1991. Homooligomerization of the hemagglutinin-neuraminidaseglycoprotein of human parainfluenza virus type 3 occurs before the acquisition of correct intramolecular disulfide bonds and mature immunoreactivity. *J.Virol.* 65(5):2362-2371.
- Connolly, T., and R. Gilmore. 1989. The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell.* 57(4).

- Copeland, C. S., R. W. Doms, E. M. Bolzau, R. G. Webster, and A. Helenius. 1986. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J. Cell Biol.* **103**:1179-1191.
- Cosson, P., and F. Letourneur. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*. **263**:1629-1631.
- Crowley, K. S., S. Liao, V. E. Worrell, G. D. Reinhart, and A. E. Johnson. 1994. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*. **78**(3):461-471.
- David, V., F. Hochstenbach, S. Rajagopalan, and M. B. Brenner. 1993. Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *J. Biol. Chem.* **268**:9585-9592.
- Davis, G. L., Lau, J. Y. 1997. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology*. **26**(3): 122S-127S.
- De Francesco, R., A. Urbani, M. C. Nardi, L. Tomei, C. Steinkuhler, and A. Tramontano. 1996. A zinc binding site in viral serine proteinases. *Biochemistry*. **35**(41).
- 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.
- Degen, E., M. F. Cohen-Doyle, and D. B. Williams. 1992. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β 2-microglobulin and peptide. *J. Exp. Med.* **175**:1653-1661.
- Degen, E., and D. B. Williams. 1991. Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Cell. Biol.* **112**(6):1099-1115.
- 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.
- Di Bisceglie, A. M. 1997. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*:34S-38S.
- Di Bisceglie, A. M., 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.
- Doms, R. W., D. S. Keller, A. Helenius, and W. E. Balch. 1987. Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J. Cell. Biol.* **105**(5):1957-1969.
- Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose, and A. Helenius. 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*. **193**:545-562.
- 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**:579-584.
- Dorner, A. J., M. G. Krane, and R. J. Kaufman. 1988. Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**:4063-4070.
- Dorner, A. J., L. C. Wasley, and R. J. Kaufman. 1992. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *The EMBO Journal*. **11**(4):1563-1571.
- Dorner, A. J., L. C. Wasley, and R. J. Kaufman. 1989. Synthesis of secreted protein induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **264**:20602-20607.

- 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.
- Durazzo, M., T. Philipp, F. N. Van Pelt, B. Luttig, E. Borghesio, G. Michel, E. Schmidt, S. Loges, M. Rizzetto, and M. P. Manns. 1995. Heterogeneity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology.* **108**(2):455-462.
- 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**:574-580.
- 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.
- Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms. 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
- 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.
- Edman, J. C., L. Ellis, R. W. Blacher, R. A. Roth, and W. J. Rutter. 1985. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature.* **317**:267-270.
- Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, D. Stoll, T. Rümenapf, and H.-J. Thiel. 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**:4131-4135.
- Elliott, J. G., J. D. Oliver, and S. High. 1997. The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins [published erratum appears in *J Biol Chem* 1997 Aug 8;272(32):20312]. *The Journal of Biological Chemistry.* **272**(21):13849-13855.
- 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. 1996a. Interferon sensitivity determining sequence of the hepatitis C virus genome. *Hepatology.* **24**:460.
- Enomoto, N., N. Takada, S. Takase, A. Takada, and T. Date. 1990a. Nucleotide sequences and subtypes of hepatitis C virus genomes. *Gastroenterol. Jpn.* **25**:405.
- Erickson, A. L., M. Houghton, Q.-L. Choo, A. J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore, and C. M. Walker. 1993. Hepatitis C virus specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J. Immunol.* **151**:4189-4199.
- Esteban, R. 1993. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology.* **17**:S67-S71.

- Evans, E. A., R. Gilmore, and G. Blobel. 1986. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:581-585.
- Everhart, J. E., D. Bisceglie, L. M. Murray, H. J. Alter, J. J. Melpolder, G. Kuo, and J. H. Hoofnagle. 1990. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. *An. Inter. Med.* **112**:544-545.
- 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.
- 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.
- Ferrari, C., A. Valli, L. Galati, A. Penna, P. Scaccaglia, T. Giuberti, C. Schianchi, G. Missale, M. G. Marin, and F. Fiaccadori. 1994. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology.* **19**:286-295.
- 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., Simons, K. 1995. The role of N-glycans in the sécrétory pathway. *Cell.* **81**: 309-312.
- Fingerhoo, 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**:2025-2030.
- Fischer, G., and F. X. Schmid. 1990. The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry.* **29**:2205-2212.
- Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, and F. X. Schmid. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature.* **337**:476-478.
- Fischer, P. B., M. Collin, G. B. Karlsson, W. James, T. D. Butters, S. J. Davis, S. Gordon, R. A. Dwek, and F. M. Platt. 1995. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *J. Virol.* **69**(9):5791-5797.
- Fischer, P. B., G. B. Karlsson, T. D. Butters, R. A. Dwek, and F. M. Platt. 1996b. N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus entry correlates with changes in antibody recognition of the V1/V2 region of gp120. *J. Virol.* **70**(10):7143-7152.
- Fischer, P. B., G. B. Karlsson, R. A. Dwek, and F. M. Platt. 1996a. N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus entry correlates with impaired gp120 shedding and gp41 exposure. *J. Virol.* **70**(10):7153-7160.
- 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.

- Flynn, G. C., T. G. Chappell, and J. E. Rothman. 1989. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*. **245**:385-390.
- Flynn, G. C., J. Pohl, M. T. Flocco, and J. E. Rothman. 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*. **353**:726-730.
- 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**:64-67.
- Fournillier-Jacob, A., A. Cahour, N. Escriou, M. Girard, and C. Wychowski. 1996a. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *Journal of General Virology*. **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.
- Frand, A. R., and C. A. Kaiser. 1998. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*. **1**:161-170.
- Freedman, R. B., N. J. Bulleid, H. C. Hawkins, and J. L. Paver. 1989. Role of protein disulfide isomerase in the expression of native proteins. *Biochem. Soc. Symp.* **55**:167-192.
- Freedman, R. B., T. R. Hirst, and M. T. Tuite. 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *TIBS*. **19**:331-336.
- Freskgard, P.-O., N. Bergenhem, B.-H. Jonsson, M. Svensson, and U. Carlsson. 1992. Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science*. **258**:466-468.
- Frydman, J., and F. U. Hartl. 1996. Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science*. **272**:1497-502.
- Fu, J., M. Ren, and G. Kreibich. 1997. Interactions among subunits of the oligosaccharyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **272(47)**:29687-29692.
- 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.
- Gafvelin, G., M. Sakaguchi, H. Andersson, and G. von Heijne. 1997. Topological rules for membrane protein assembly in eucaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **272(10)**:6119-6127.
- Gahmberg, C. G., and M. Tolvanen. 1996. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **21(8)**:308-311.
- Gale, M. J., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1998a. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5208-18.
- 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.
- Gallagher, P., J. Henneberry, I. Wilson, J. Sambrook, and M.-J. Gething. 1988. Addition of carbohydrate side chains at novel sites on Influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule. *The Journal of Cell Biology*. **107**:2059-2073.

- Gaudin, Y. 1997. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Virology*. **71**(5):3742-3750.
- 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.
- Geissler, M., A. Gesien, and J. R. Wands. 1997. Inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune responses to hepatitis C virus core protein are reversed by genetic immunizations augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* **159**:5107-5113.
- 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. *Journal of Hepatology*. **22**:272-277.
- Gething, M.-J., K. McCammon, and J. Sambrook. 1986. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell*. **46**:939-950.
- Gething, M.-J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. **355**:33-45.
- Gilbert, H. F. 1994a. The formation of native disulfide bonds, p. 104-136. *In* R. H. Pain (ed.), *Mechanisms of protein folding*. IRL Press, Oxford.
- Giuggio, V. M., H. L. Bonkovsky, J. Smith, and A. L. Rothman. 1998. Inefficient recognition of autologous viral sequences by intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronically infected subjects. *Virology*. **251**:132-140.
- Gooding, L. R. 1992. Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell*. **71**:5-7.
- 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**:1338-1343.
- Görlich, D., and T. A. Rapoport. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*. **75**(4):615-630.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993b. 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. 1993c. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:10583-10587.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1994. Hepatitis C virus polyprotein processing. *Viral Hepatitis and Liver Disease*:136-139.
- Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993a. 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**(5):367-381.
- Gwack, Y., D. W. Kim, J. H. Han, and J. Choe. 1996. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**(2).
- Haas, I. G., and M. Wabl. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. **306**:387-389.
- Habersetzer, F., A. Fournillier, J. Dubuisson, D. Rosa, S. Abrignani, C. Wychowski, I. Nakano, C. Trépo, C. Desgranges, and G. Inchauspé. 1998. Characterization of human monoclonal antibodies specific to the hepatitis C virus glycoprotein E2 with in vitro binding neutralization properties. *Virology*. **249**:32-41.



- **Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius.** 1994a. Role of N-linked oligosaccharides recognition, glucose trimming and calnexin during glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:913-917.
- **Hammond, C., and A. Helenius.** 1994b. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science.* **266**:456-458.
- **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.
- **Hanein, D., K. E. Matlack, B. Jungnickel, K. Plath, K. U. Kalies, K. R. Miller, T. A. Rapoport, and C. W. Akey.** 1996. Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell.* **87**(4):721-732.
- **Hansen, J. E.** 1992. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. *APMIS Suppl.* **27**.
- **Harada, S., Y. Watanabe, K. Takeuchi, T. Suzuki, T. Katayama, Y. Takebe, I. Saito, and T. Miyamura.** 1991. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J. Virol.* **65**(6):3015-3021.
- **Harding, M. W., R. E. Handschumacher, and D. W. Speicher.** 1986. Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *Biol. Chem.* **261**(18):8547-8555.
- **Harris, M. R., Y. Y. Yu, C. S. Kindle, T. H. Hansen, and J. C. Solheim.** 1998. Calreticulin and calnexin interact with different protein and glycan determinants during the assembly of MHC class I. *Journal of Immunology.* **160**(11):5404-5409.
- **Hart, G. W., K. Brew, G. A. Grant, R. A. Bradshaw, and W. J. Lennarz.** 1979. Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosyl bond in glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **254**:9747-9753.
- **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. *Journal of Infectious Diseases.* **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.
- **Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius.** 1996. Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *The EMBO Journal.* **15**(12):2961-2968.
- **Hebert, D. N., J. F. Simons, J. R. Peterson, and A. Helenius.** 1995a. Calnexin, calreticulin, and BiP/Kar2p in protein folding. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* **LX**:405-415.
- **Hebert, D.N., Foellmer, B., Helenius, A.** 1995b. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **81**: 425-433.

- Hebert, D. N., J. X. Zhang, W. Chen, B. Foellmer, and A. Helenius. 1997. The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J. Cell. Biol.* **139**(3):613-623.
- Hegde, R. S., S. Voigt, T. A. Rapoport, and V. R. Lingappa. 1998. TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell.* **92**:621-631
- Helenius, A. 1994. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **5**(3):253-265.
- Hendershot, L. M. 1990. Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated in vivo by light chain addition. *J. Cell Biol.* **111**:829-837.
- Hendershot, L. M., J. Y. Wei, J. R. Gaut, B. Lawson, P. J. Freiden, and K. G. Murti. 1995. In vivo expression of mammalian BiP ATPase mutants causes disruption of the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **6**(3):283-296.
- 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, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno. 1991a. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**:220-228.
- Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno. 1991b. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:5547-5551.
- Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993a. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* **67**:4665-4675.
- Hiller, M. M., A. Finger, M. Schweiger, and D. H. Wolf. 1996. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* **273**:1725-1728.
- Hirano, N., F. Shibasaki, H. Kato, R. Sakai, T. Tanaka, J. Nishida, Y. Yazaki, T. Takenawa, and H. Hirai. 1994. Molecular cloning and characterization of a cDNA for bovine phospholipase C- α : proposal of redesignation of phospholipase C- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**(1):375-382.
- Hirano, N., F. Shibasaki, R. Sakai, T. Tanaka, J. Nishida, Y. Yazaki, T. Takenawa, and H. Hirai. 1995. Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol dependent reductase. *Eur. J. Biochem.* **234**:336-342.
- Hiranuma, K., S. Tamaki, Y. Nishimura, S. Kusuki, M. Isogawa, G. Kim, M. Kaito, K. Kuribayashi, Y. Adachi, and Y. Yasutomi. 1999. Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **80**:187-193.
- Hobbs, H. H., D. W. Russell, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1990. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**:133-170.
- Hochstenbach, F., V. David, S. Watkins, and M. B. Brenner. 1992. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**(10):4734-4738.

- Hoffman, R. M., H. M. Diepolder, R. Zachoval, F. Zwiebel, M. Jung, S. Scholtz, H. Nitschko, G. Reithmüller, and G. R. Pape. 1995. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology*. **21**:632-638.
- Hohler, T., G. Gerken, A. Notghi, P. Knolle, R. Lubjuhn, H. Taheri, P. M. Schneider, K. H. Meyer zum Buchenfelde, and C. Rittner. 1997. MHC class II genes influence the susceptibility to chronic active hepatitis C. *Journal of Hepatology*. **27**:259-264.
- Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:237-271.
- Holst, B., A. W. Brunn, C. K. Kielland, and J. R. Winther. 1996. Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal*. **15**:3538-3546.
- Honda, M., L.-H. Ping, R. C. A. Runbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S. M. Lemon. 1996. Structural requirements for initiation of translation by Internal Ribosome Entry within genome-length Hepatitis C virus RNA. *Virology*. **222**:31-42.
- 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**:4261-4268.
- Houghton, M. 1996. Hepatitis C viruses, p. 1035-1058. *In* B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, Third edition ed. Raven Press, New York.
- 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**:381-388.
- Hsu, H. H., M. Donets, H. B. Greenberg, and S. M. Feinstone. 1993. Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system. *Hepatology*. **17**(5):763-771.
- Hughes, E. A., C. Hammond, and P. Cresswell. 1997. Misfold major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**:1896-1901.
- 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**:2482-2486.
- Hurtley, S. M., D. G. Bole, H. Hoover-Litty, A. Helenius, and C. S. Copeland. 1989b. Interactions of misfolded Influenza Virus Hemagglutinin with binding protein (BiP). *The Journal of Cell Biology*. **108**:2117-2126.
- Hurtley, S. M., and A. Helenius. 1989a. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:277-307.
- 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, C., A. J. Sinskey, and H. F. Lodish. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. **257**:1496-1502.
- 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.
- Iacobelli, S., I. Bucci, M. D'Egidio, C. Giuliani, C. Natoli, N. Tinari, M. Rubinstein, and J. Schlessinger. 1993. Purification and characterization of a 90 kDa protein released from human tumors and tumor cell lines. *The FEBS Letter*. **319**(1-2):59-65.
- 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.

- Imawari, M., M. Nomura, T. Kaieda, T. Moriyama, K. Oshimi, I. Nakamura, T. Gunji, S. Ohnishi, T. Ishikawa, H. Nakagama, and e. al. 1989. Establishment of a human T-cell clone cytotoxic for both autologous and allogenic hepatocytes from chronic hepatitis patients with type non-A non-B virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **86**:2883-2887.
- Inchauspé, G., M. E. Major, I. Nakano, L. Vivitski, and C. Treppe. 1997. DNA vaccination for the induction of immune response against hepatitis C virus proteins. *Vaccine*. **15**:953-956.
- Inohara, H., S. Akahani, K. Koths, and A. Raz. 1996. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res*. **56**(19):4330-4334.
- 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.
- Ishii, K., D. Rosa, Y. Watanabe, T. Katayama, H. Harada, C. Wyatt, K. Kiyosawa, H. Aizaki, Y. Matsuura, M. Houghton, S. Abrignani, and T. Miyamura. 1998. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. **28**:1117-1120.
- 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.
- Jackson, M. R., M. F. Cohen-Doyle, P. A. Peterson, and D. B. Williams. 1994a. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science*. **263**:384-387.
- Jackson, M. R., T. Nilsson, and P. A. Peterson. 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal*. **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.
- Janolino, V. G., and H. E. Swaisgood. 1987. Sulfhydryl oxidase-catalyzed formation of disulfide bonds in reduced ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys*. **258**(1):265-271.
- John, D. C., M. E. Grant, and N. J. Bulleid. 1993. Cell-free synthesis and assembly of prolyl 4-hydroxylase: the role of the beta-subunit (PDI) in preventing misfolding and aggregation of the alpha-subunit. *The EMBO Journal*. **12**(4):1587-1595.
- Jyn, L. 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. IV. Pathogenetic mechanisms involved in hepatitis C virus-induced liver diseases. *Am. J. Physiol*. **275**:G1217-1220.
- 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. *Journal of General Virology*:1755-1760.
- Kaminski, A., S. L. Hunt, J. G. Patton, and R. J. Jackson. 1995. Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA*. **1**(9):924-938.
- 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.
- Kang, H. S., and W. J. Welch. 1991. Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J. Biol. Chem*. **266**(9):5643-5649.

- Kapoor, M., L. Zhang, M. Ramachandra, J. Kusakawa, K. E. Ebner, and R. Padmanabhan. 1995. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* **270**(32):19100-19106.
- Karpas, A., G. W. Fleet, R. A. Dwek, S. Petursson, S. K. Namgoong, N. G. Ramsden, G. S. Jacob, and T. W. Rademacher. 1988. Aminosugar derivatives as potential anti-human immunodeficiency virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jul;86(14):5625). **85**(23):9229-9233.
- 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., M. Hijikata, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, T. Sugimura, and K. Shimotohno. 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA.* **87**:9524-9528.
- 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.
- Kelleher, D. J., G. Kreibich, and R. Gilmore. 1992. Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell.* **69**(1):55-65.
- 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-alpha therapy in french patients. *J. Hepathol.* **27**:72-77.
- Kim, D. W., Y. Gwack, J. H. Han, and J. Choe. 1995a. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:160-166.
- 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. 1996a. 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**:343-355.
- Kim, P. S., and P. Arvan. 1995b. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **128**:29-38.
- Kim, P. S., and P. Arvan. 1991. Folding and assembly of newly synthesized thyroglobulin occurs in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **266**(19):12412-12418.
- Kiyosawa, K., T. Sodeyama, E. Tanaka, Y. Gibo, K. Yoshizawa, Y. Nakano, S. Furuta, Y. Akahane, K. Nishioka, R. H. Purcell, and a. l. 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 e. al. 1994. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community- acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. *Gastroenterology.* **106**:1596-1602.
- Kleter, B., J. T. Brouwer, F. Nevens, D. L. van, A. Elewaut, J. Versieck, P. P. Michielsen, M. L. Hautekeete, R. A. Chamuleau, R. Brenard, N. Bourgeois, M. Adler, W. G. Quint, C. M. Bronkhorst, R. A. Heijtkink, 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**:32-38.
- Kleter, G. E., L. J. van Doorn, J. T. Brouwer, S. W. Schalm, R. A. Heijtkink, and W. G. Quint. 1994. Sequence analysis of the 5' untranslated region in isolates of at least four genotypes of hepatitis C virus in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **32**(2):306-310.
- Kohama, T., T. A. Sato, F. Kobune, and A. Sugiura. 1985. Maturation of measles virus hemagglutinin glycoprotein. *Arch. Virol.* **85**(3-4):257-268.
- Kohara, M., K. Tsukiyama-Kohara, N. Maki, K. Asano, K. Yamaguchi, K. Miki, S. Tanaka, N. Hattori, Y. Matsuura, I. Saito, and e. al. 1992. Expression and characterization of glycoprotein gp35 of hepatitis C virus using recombinant vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **73**:2313-2318.
- 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.
- Konishi, E., and P. W. Mason. 1993. Proper maturation of the Japanese Encephalitis Virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J. Virol.* **67**:1672-1675.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631.
- 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.
- Koziel, M. J. 1997. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat. Suppl.* **2**:31-41.
- Koziel, M. J., D. Dudley, J. T. Wong, J. Dienstag, M. Houghton, R. Ralston, and B. D. Walker. 1993. Intrahepatic cytotoxic lymphocytes-T specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J. Immunol.* **149**:3339-3344.
- Krause, K.-H., and M. Michalak. 1997. Calreticulin. *Cell*. **88**:439-443.
- 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.
- Kremsdorf, D., C. Porchon, J. P. Kim, G. R. Reyes, and C. Bréchet. 1991. Partial nucleotide sequence analysis of a french hepatitis C virus: implications for HCV genetic variability in variability in the E2/NS1 protein. *Journal of General Virology*. **72**:2557-2561.
- 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 e. al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. **244**:362-364.
- Kurauchi, O., T. Furui, A. Itakura, H. Ishiko, M. Sugiyama, Y. Ohno, H. Ando, A. Tanamura, T. Ishida, A. Nawa, and a. et. 1993. Studies on transmission of hepatitis C virus from mother-to-child in the perinatal period. *Arch. Gynecol. Obstet.* **253**:121-126.
- Kuznetsov, G., L. B. Chen, and S. K. Nigam. 1997. Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(5):3057-3063.

- **Kuznetsov, G., L. B. Chen, and S. K. Nigam.** 1994. Several endoplasmic reticulum stress proteins, including ERp72, interact with thyroglobulin during its maturation. *The Journal of Biological Chemistry.* **269(37):**22990-22995.
- **LaMantia, M. L., and W. J. Lennarz.** 1993. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell.* **74(5):**899-908.
- **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:**9340-9348.
- **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.
- **Laskey, R. A., B. M. Honda, A. D. Mills, and J. T. Finch.** 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* **275:**416-420.
- **Le, S. Y., N. Sonenberg, and J. V. J. Maizel.** 1995. Unusual folding regions and ribosome landing pad within hepatitis C, virus and pestivirus RNAs. *Gene* **154(2).** **154(2):**137-143.
- **Lerat, H., and G. Inchauspé.** 1997. Tropisme extrahépatique du Virus de l'hépatite C. *Virologie.* **1(4):**291-300.
- **Levy, S., S. C. Todd, and H. T. Maecker.** 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **16:**89-109.
- **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. Trépo.** 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.
- **Lièvremon, J. P., R. Rizzuto, L. Hendershot, and J. Meldolesi.** 1997. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **272:**30873-30879.
- **Lin, C., B. D. Lindenbach, B. Pragai, D. W. McCourt, and C. M. Rice.** 1994a. Processing of 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., 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:**6465-6471.
- **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:**288-291.
- **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.
- **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.

- Lo, S. Y., M. J. Selby, and J. H. Ou. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J. Virol.* **70**(8):5177-5182.
- Lodish, H. F., and N. Kong. 1993. The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum. *J. Biol.Chem.* **268**(27):20598-20605.
- Love, R. A., H. E. Parge, J. A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E. W. Moomaw, T. Adachi, and Z. Hostomska. 1996. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell.* **87**(2):331-342.
- Lücke, H. 1995. Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.* **228**:531-550.
- Lundstrom, L. J., U. Birnbach, K. Rupp, H. D. Soling, and A. Holmgren. 1995. Two resident ER-proteins, CaBP1 and CaBP2, with thioredoxin domains, are substrates for thioredoxin reductase: comparison with protein disulfide isomerase. *The FEBS Letter.* **357**:305-308.
- 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.
- Lütcke, H., S. High, K. Romisch, A. J. Ashford, and B. Dobberstein. 1992. The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. *TheEMBO Journal.* **11**(4):1543-1551.
- Lütcke, H. Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.* **228**: 531-550.
- Lyman, S. K., and R. Schekman. 1997. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell.* **88**:85-96.
- Machamer, C. E., R. W. Doms, D. G. Bole, A. Helenius, and J. K. Rose. 1990. Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of Vesicular Stomatitis Virus G protein. *The Journal of Biological Chemistry.* **265**:6879-6883.
- Manns, M. P., and P. Obermayer-Straub. 1997. Viral induction of autoimmunity: mechanisms and examples in hepatology. *J. Viral Hepatol.* **4** (suppl.2):42-47.
- Margolese, L., G. I. Waneck, C. K. Suzuki, E. Degen, R. A. Flavell, and D. B. Williams. 1993. Identification of the region on the class I histocompatibility molecule that interacts with the molecular chaperone, p88 (calnexin, IP90). *Journal of Biological Chemistry.* **268**(24):17959-17966.
- Marquardt, T., D. N. Herbert, and A. Helenius. 1993. Post-translational folding of Influenza Hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes. *The Journal of Biological Chemistry.* **268**:19618-19625.
- 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.

- **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., 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.
- **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. *Journal of Medical Virology.* **45**:241-246.
- **Mazzarella, R. A., M. Srinivasan, S. M. Haugejorden, and M. Green.** 1990. ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry.* **265**(2):1094-1101.
- **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**:4893-4905.
- **McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* **53**(1):55-67.
- **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. *The Lancet.* **345**:1209-1211.
- **Meldolesi, J., and T. Pozzan.** 1998. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *TIBS.* **23**:10-14.
- **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**:441-444.
- **Melnick, J., S. Aviel, and Y. Argon.** 1992. The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with assembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**:21303-21306.
- **Melnick, J., J. L. Dul, and Y. Argon.** 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature.* **370**:373-375.
- **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. l. 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*:581-589.
- **Meunier, J. C., A. Fournillier, A. Choukhi, A. Cahour, L. Cocquerel, J. Dubuisson, and C. Wychowski.** 1999. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J. Gen. Virol.* **80**:887-896.
- **Meurs, E. F.** 1997. Mécanismes d'action antivirale de l'interféron. *Virologie.* **1**:481-497.

- 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.
- Michalak, M., R. E. Milner, K. Burns, and M. Opas. 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal*. **285**:681-692.
- 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. USA*. **87**:2057-61.
- Milner, R. E., S. Baksh, C. Shemanko, M. R. Carpenter, L. Smillie, J. E. Vance, M. Opas, and M. Michalak. 1991. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**(11):7155-7165.
- Mink, M. A., S. Benichou, P. Madaule, P. Tiollais, A. M. Prince, and G. Inchauspe. 1994. Characterization and mapping of a B-cell immunogenic domain in hepatitis C virus E2 glycoprotein using a yeast peptide library. *Virology*. **200**:246-255.
- Minutello, M. A., P. Pileri, D. Unutmaz, S. Censini, G. Kuo, M. Houghton, M. R. Brunetto, F. Bonino, and S. Abrignani. 1993. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J. Exp. Med.* **178**:17-25.
- Mirazimi, A., and L. Svensson. 1998a. 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**:201-204.
- Miyamura, H., and Y. Matsuura. 1993. Structural proteins of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology*. **1**:229-231.
- Mizushima, H., M. Hijikata, S. I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994a. 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. 1994b. 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. 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**:178-182.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* **4**:1065-1067.
- 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.
- Mothes, W., S. U. Heinrich, R. Graf, I.-M. Nilsson, G. von Hejne, and J. Brunner. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell*. **89**:523-533.
- Mothes, W., S. Prehn, and T. A. Rapoport. 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *The EMBO Journal*. **13**(17):3973-3982.

- 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.
- Mulvey, M., and D. T. Brown. 1995. Involvement of the molecular chaperone BiP in maturation of Sindbis virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **69**(3):1621-1627.
- Munro, S., and H. Pelham. 1985. What turns on heat shock genes? *Nature.* **317**:477-478.
- Munro, S., and H. R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* **48**:899-907.
- Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1986. An hsp-70 like protein in the ER: identity with the 78 Kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* **46**:291-300.
- Muresan, Z., and P. Arvan. 1997. Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **272**:26095-26102.
- Nakagiri, I., and K. Ichihara. 1995. ELISA for anti-HCV antibody employing a shorter synthetic core region peptide. *J. Virol. Methods.* **52**:195-207.
- Nauseef, W.M., McCormick, S.J. Clarck, R.A. 1995. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase.
- Nicchitta, C. V., and G. Blobel. 1993. Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. *Cell.* **73**(5):989-998. *The Journal of Biological Chemistry.* **270**(9): 4741-4747.
- Nigam, S. K., A. L. Goldberg, S. Ho, M. F. Rohde, K. T. Bush, and M. Y. Sherman. 1994. A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca²⁺-binding proteins and members of the Thioredoxin superfamily. *The Journal of Biological Chemistry.* **269**(3):1744-1749.
- Nilsson, B., and S. Anderson. 1991a. Proper and improper folding of proteins in the cellular environment. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:607-635.
- Nilsson, T., and G. Warren. 1994a. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**(4):517-521.
- Noursbaum, J. B., S. Pol, B. Nalpas, P. Landais, P. Berthelot, C. Bréchet, 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.
- Ogata, N., H. J. Alter, R. H. Miller, and R. H. Purcell. 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **88**:3392-3396.
- Ohto, H., S. Terazawa, N. Sasaki, K. Hino, C. Ishiwata, M. Kaka, N. Ujiie, C. Endo, A. Matsui, and e. al. 1994. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *The New England Journal of Medicine.* **330**:744-750.
- Okamoto, H., K. Kurai, S. I. Okada, K. Yamamoto, H. Lizuka, T. Tanaka, S. Fukuda, F. Tsuda, and S. Mishiro. 1992. Full-length sequence of a hepatitis C genome having poor homology to reported isolates. Comparative study of four distinct genotypes. *Virology.* **188**:331-341.
- 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.
- Oliver, J. D., F. J. van der Wal, N. J. Bulleid, and S. High. 1997. Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science.* **275**:86-88.
- Opas, M., M. Szweczenko-Pawlikowski, G. K. Jass, N. Mesaali, and M. Michalak. 1996. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *The Journal of Cell Biology.* **135**(6):1913-1923.

- Opdenakker, G., P. M. Rudd, C. P. Ponting, and R. A. Dwek. 1993. Concepts and principles of glycobiology. *The FASEB Journal*. 7:1330-1337.
- Ostwald, T. J., and D. H. MacLennan. 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249(3):974-979.
- Otteken, A., Moss, B. 1996a. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(1): 97-103.
- Otteken, A., P. L. Earl, and B. Moss. 1996b. Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *Journal of Virology*. 70(6):3407-3415.
- 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.
- Owens, R. J., and R. W. Compans. 1990. The human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor acquires aberrant intermolecular disulfide bonds that may prevent normal proteolytic processing. *Virology*. 179(2):827-833.
- Palleros, D. R., K. L. Reid, L. Shi, W. J. Welch, and A. L. Fink. 1993. ATP-induced protein-Hsp-70 complex dissociation requires K^+ but not ATP hydrolysis. *Nature*. 365:664-666.
- Pawlotsky, 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.
- Pawlotsky, J. M., Roudot, Thoraval F., Bastie, A., Pellet, C., Duval, J., Dhumeaux, D. 1996a. Are hepatitis C virus genotypes 1a and 1b so different? [letter; comment]. *Hepatology*. 23: 1289-1291.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O., Dhumeaux, D. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* 72: 2795-2805.
- Pelham, H. R. 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:1-23.
- Pelham, H. R. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*. 46(7):959-961.
- 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.
- Pettersson, R. F. 1991. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170:67-104.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938-941.
- Pilon, M., R. Schekman, and K. Romisch. 1997. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO Journal*. 16(15):4540-4548.
- Pittau, E., A. Bogliolo, A. Tinti, Q. Mela, G. Ibba, G. Salis, and G. Perpignano. 1997. Development of arthritis and hypothyroidism during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15(4):415-419.

- 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.
- Pless, D. D., and W. J. Lennarz. 1977. Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**(1):134-138.
- Pollard, M. J., K. J. Travers, and J. S. Weissman. 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell.* **1**:171-182.
- Poulsen, L. L., and D. M. Ziegler. 1977. Microsomal mixed-function oxidase-dependent renaturation of reduced ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* **183**(2):563-570.
- 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.
- 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.
- Puig, A., and H. F. Gilbert. 1994a. Protein Disulfide Isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry.* **269**(10):7764-7771.
- 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. *The Embo Journal.* **17**:3521-3533.
- 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**:273-277.
- Qu, D., J. H. Teckman, S. Omura, and D. H. Perlmutter. 1996. Degradation of a mutant secretory protein, alphan₁-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol. Chem.* **271**(37):22791-22795.
- Rademacher, T., R. B. Parekh, and R. Dwek. 1988. Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:785-838.
- Rajagopalan, S., Y. Xu, and M. B. Brenner. 1994. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science.* **263**:387-390.
- 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.
- Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer, and R. Ray. 1996a. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* **70**:4438-4443.
- Ray, R. B., K. Meyer, and R. Ray. 1996b. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology.* **226**:176-182.
- Reed, K. E., A. E. Gorbalenya, and C. M. Rice. 1998b. 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.
- Reynolds, J. E., A. Kaminski, H. J. Kettinen, K. Grace, B. E. Clarke, A. R. Carroll, D. J. Rommlands, and R. J. Jackson. 1995. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *The EMBO Journal.* **14**(23):6010-6020.

- 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. *The FEBS Letter*. **365**:115-119.
- Robbins, P. W., R. B. Trimble, 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-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* **259**(12):7577-7583.
- Rodan, A. R., J. F. Simons, E. S. Trombetta, and A. Helenius. 1996. N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin. *The EMBO Journal*. **15**(24):6921-6930.
- Rosa, D., S. Campagnoli, C. Moretto, E. Guenzi, L. Cousens, M. Chin, C. Dong, A. Weiner, J. Y. N. Lau, Q.-L. Choo, D. Chien, P. Pileri, M. Houghton, and S. Abrigniani. 1996. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of the envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:1759-1763.
- 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.
- Roudot-Thoraval, F., J. M. Pawlotsky, V. Thiers, L. Defeorges, P. P. Girollet, F. Guillot, C. Huraux, P. Aumont, C. Bréchet, and D. Dhumeaux. 1993. Lack of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-seronegative women: a prospective study with hepatitis C virus RNA testing. *Hepatology*. **17**:772-777.
- Rupp, K., U. Birnbach, J. Lundstrom, P. N. Van, and H. D. Soling. 1994. Effects of CaBP2, the rat analog of ERp72, and of CaBP1 on the refolding of denatured reduced proteins. Comparison with protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* **269**(4):2501-2507.
- 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., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* **69**(12):7461-7471.
- Sasaki, T., C. Brakebusch, J. Engel, and R. Timpl. 1998. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. *The EMBO Journal*. **17**(6):1606-1613.
- Sato, K., H. Okamoto, S. Aihara, Y. Hoshi, T. Tanaka, and S. Mishiro. 1993. Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology*. **196**(1):354-357.
- Savitz, A. J., and D. I. Meyer. 1993. 180-kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation. *J. Cell. Biol.* **120**(4):853-863.
- Schatz, G., and B. Dobberstein. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*. **271**:1519-1526.
- Scheffner, M., U. Nuber, and J. M. Huibregtse. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*. **373**.
- Scherens, B., E. Dubois, and F. Messenguy. 1991. Determination of the sequence of the yeast YCL313 gene localized on chromosome III. Homology with the protein disulfide isomerase (PDI gene product) of other organisms. *Yeast*. **7**(2):185-193.

- Schiff, E. R. 1997. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology*. **26**(3):39S-42S.
- Schonbrunner, E. R., and F. X. Schmid. 1992. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**(10):4510-4513.
- 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. *The EMBO Journal*. **13**:1696-1705.
- Selby, M., A. Erickson, C. Dong, S. Cooper, P. Parham, M. Houghton, and C. M. Walker. 1999. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules. *Journal of Immunology*. **162**:669-676.
- Selby, M. J., Q.-L. Choo, K. Berger, G. Kuo, E. Glazer, M. Eckart, C. Lee, D. Chien, C. Kuo, and M. Houghton. 1993. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J. Gen. Virol.* **74**:1103-1113.
- 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.
- 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**(11):6363-6366.
- Shenkman, M., M. Ayalon, and G. Z. Lederkremer. 1997. Endoplasmic reticulum quality control of asialoglycoprotein receptor H2a involves a determinant for retention and not retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**(21):11363-11368.
- Shih, C.-M., C.-M. Chen, S.-Y. Chen, and Y.-H. W. Lee. 1995. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J. Virol.* **69**:1160-1171.
- 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**:127-132.
- 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. *Journal of Virology*. **68**:1494-1500.
- Shirai, M., T. Arichi, M. Chen, M. Nishioka, K. Ikeda, H. Takahashi, N. Enomoto, T. Saito, M. E. Major, T. Nakazawa, T. Akatsuka, S. M. Feinstone, and J. A. Berzofsky. 1999. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *Journal of Immunology*. **162**:568-576.
- Shirai, M., M. Chen, T. Arichi, T. Masaki, M. Nishioka, M. Newman, T. Nakazawa, S. M. Feinstone, and J. A. Berzofsky. 1996. Use of intrinsic helper epitopes for in vivo induction of anti-hepatitis C virus cytotoxic T lymphocytes (CTL) with CTL epitope peptide vaccines. *J. Infect. Dis.* **173**:24-31.
- 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 efficiency of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. *Gastroenterology*. **113**:558-566.

- Silini, E., F. Bono, A. Cividini, A. Cerino, S. Bruno, S. Rossi, G. Belloni, B. Brugnetti, E. Civardi, L. Salvaneschi, and a. l. et. 1995a. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology*. **21**:285-290.
- 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**:1396-1400.
- 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. *Journal of General Virology*. **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**:4775-4782.
- Sorger, P. K., and H. R. Pelham. 1987. The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J. Mo. Biol.* **194**(2):341-344.
- 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 e. al. 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**:515-519.
- Soto, C., and B. Frangione. 1995. Two conformational states of amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **186**(2-3):115-118.
- Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia, and A. J. Parodi. 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry*. **31**:97-105.
- Sousa, M. C., and A. J. Parodi. 1995. The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase. *The EMBO Journal*. **14**:4196-4203.
- Spiro, R. G., Q. Zhu, V. Bhoyroo, and H. D. Söling. 1996. Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* **271**:11588-11594.
- 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.
- Stuyver, L., R. Rossau, A. Wyseur, M. Duhamel, B. Vanderborght, H. Vanheuerswyn, and G. Maertens. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a Line Probe Assay. *J. Gen. Virol.* **74**:1093-1102.
- Suzuki, T., H. Park, K. Kitajima, and W. J. Lennarz. 1998. Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. *J. Biol. Chem.* **273**(34):21526-21530.
- 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.
- 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**:2270-2276.
- Takamizawa, A., C. Mori, I. Fuke, S. Manabe, S. Murakami, J. Fujita, E. Onishi, T. Andoh, I. Yoshida, and H. Okayama. 1991. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* **65**:1105-1113.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno. 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. Shimotohno. 1992. Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier: sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Research.* **23**:39-53.
- Tang, B. L., S. H. Wong, X. L. Qi, S. H. Low, and W. Hong. 1993. Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell. Biol.* **120**(2):325-328.
- 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.
- Tanji, Y., T. Kaneko, S. Satoh, and K. Shimotohno. 1995. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* **69**(7):3980-3986.
- Tatu, U., C. Hammond, and A. Helenius. 1995. Folding and oligomerization of influenza hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment. *The EMBO Journal.* **14**(7):1340-1348.
- Thomas, P. J., B. H. Qu, and P. L. Pedersen. 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**:456-459.
- Tinari, N., C. Natoli, N. D'Ostilio, F. Ghinelli, L. Sighinolfi, L. Ortona, E. Tamburrini, M. Piazza, A. Chirianni, L. Guerra, P. Di Gregorio, and S. Iacobelli. 1998. 90K (Mac-2 BP) predicts CD4 decline in human immunodeficiency virus-infected patients with CD4 counts above 200 x 10⁶ cells/L. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **122**(2):178-181.
- 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.
- 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. et. 1993. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood.* **81**:412-418.
- Trombetta, E. S., and A. Helenius. 1998. Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**(5):587-592.
- Trombetta, S. E., M. Bosch, and A. J. Parodi. 1989. Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry.* **28**(20):8108-8116.
- Trombetta, S. E., S. A. Ganam, and A. J. Parodi. 1991. The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology.* **1**(2):155-161.

- Trombetta, S. E., and A. J. Parodi. 1992. purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**:9236-9240.
- 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**:95-98.
- Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto, and K. Shimotohno. 1997. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J. Virol.* **71**:6720-6726.
- Tsukiyama-kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal Ribosome Entry Site Within Hepatitis-C Virus RNA. *J. Virol.* **66**:1476-1483.
- Ullrich, A., I. Sures, M. D'Egidio, B. Jallal, T. J. Powell, R. Herbst, A. Dreps, M. Azam, M. Rubinstein, C. Natoli, and e. al. 1994. The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *J. Biol. Chem.* **269**(28):18401-18407.
- Urade, R., Y. Takenaka, and M. Kito. 1993. Protein degradation by ERp72 from rat and mouse liver endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry.* **268**(29):22004-22009.
- 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.
- Van der Poel, C. I., H. T. Cuyppers, and H. W. Reesink. 1994. Hepatitis C virus six years on. *The Lancet.* **344**:1475-1479.
- Van der Wal, F. J., J. D. Oliver, and S. High. 1998. The transient association of ERp57 with N-glycosylated proteins is regulated by glucose trimming. *Eur. J. Biochem.* **256**(1):51-59.
- van Doorn, L.-J. 1994. Review: Molecular Biology of the Hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology.* **43**:345-356.
- van Leeuwen, J. E. M., and K. P. Kearse. 1996c. The related molecular chaperones calnexin and calreticulin differentially associate with nascent T cell antigen receptor proteins within the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry.* **271**(41):25345-25349.
- Van, P. N., K. Rupp, A. Lampen, and H. D. Soling. 1993. CaBP2 is a rat homolog of ERp72 with protein disulfide isomerase activity. *Eur. J. Biochem.* **213**(2):789-795.
- Vassilakos, A., M. F. Cohen-Doyle, P. A. Peterson, M. R. Jackson, and D. B. Williams. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *The EMBO Journal.* **15**(7):1495-1506.
- Vassilakos, A., M. Michalak, M. A. Lehrman, and D. B. Williams. 1998. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry.* **37**(10):3480-3490.
- Vermeer, C. 1990. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* **266**(3):625-636.
- Wada, I., M. Kai, S. Imai, F. Sakane, and H. Kanoh. 1997. Promotion of transferrin folding by cyclic interactions with calnexin and calreticulin. *The EMBO Journal.* **16**:5420-5432.
- Wada, I., D. Rindress, P. H. Cameron, W.-J. Ou, J. J. Doherty II, D. Louvard, A. W. Bell, D. Dignard, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bergeron. 1991. SSR-alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry.* **266**(29):19599-19610.
- Wagner, N., and H. W. Rotthauwe. 1994. Hepatitis C contributes to liver disease in children and adolescents with hemophilia. *Klin. Padiatr.* **206**:40-44.

- Walter, P., and G. Blobel. 1980. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**(12):7112-7116.
- Walter, P., and G. Blobel. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*. **299**:691-698.
- 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.
- Ware, F. E., A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman, and D. B. Williams. 1995. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNac2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**(9):4697-4704.
- Wearsch, P. A., and C. V. Nicchitta. 1996. Purification and partial molecular characterization of GRP94, an ER resident chaperone. *Protein expression and purification*. **7**:114-121.
- Wei, J., J. R. Gaut, and L. M. Hendershot. 1995a. In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **270**:26677-82.
- Wei, J., and L. M. Hendershot. 1995b. Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. *J. Biol. Chem.* **270**:26670-6.
- Weiner, A. J., C. Christopherson, J. E. Hall, F. Bonino, G. Saracco, M. R. Brunetto, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, S. Venkatakrishna, T. Miyamura, J. Mchutchinson, T. Cuypers, and M. Houghton. 1991a. 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]. *The 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. *Journal of Virology*. **67**:4365-4368.
- Welch, W. J. 1987. The mammalian heat shock (or stress) response: a cellular defense mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **225**:287-304.
- Werner, E. D., J. L. Brodsky, and A. A. McCracken. 1996. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(24):13797-13801.
- Werr, M., and R. Prange. 1998. Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J. Virol.* **72**(1):778-782.
- Wickner, W. T. 1994. How ATP drives proteins across membranes. *Science*. **266**:1197-1198.
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, M. Bogoy, J. Yu, W. Mothes, T. R. Jones, T. A. Rapoport, and H. L. Ploegh. 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*. **384**:432-438.

- Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin, and R. D. Klausner. 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(24):9580-8584.
- Wilson, D. W., M. J. Lewis, and H. R. Pelham. 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**(10):7465-7468.
- Xu, A., A. R. Bellamy, and J. A. Taylor. 1998. BiP (GRP78) and endoplasmic reticulum chaperone (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *Journal of Virology.* **72**(12):9865-9872.
- Xu, Q., M. C. Leiva, S. A. Fischkoff, R. E. Handschumacher, and C. R. Lyttle. 1992. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *Biol. Chem.* **267**(17):11968-11971.
- 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.
- Yamashita, Y., K. Shimokata, S. Mizuno, T. Daikoku, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama. 1996. Calnexin acts as a molecular chaperone during the folding of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Journal of Virology.* **70**(4):2237-2246.
- 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**:8738-8743.
- Yao, Y., Y. Zhou, and C. Wang. 1997a. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *The EMBO Journal.* **16**(3):651-658.
- 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**:6048-6055.
- 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. 1997a. 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.
- Yoshida, 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.
- Yoshihara, H., K. Noda, and T. Kamada. 1998. Interrelationship between alcohol intake, hepatitis C, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Recent Dev. Alcohol.* **14**:457-469.
- 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.
- Yu, Y. H., D. D. Sabatini, and G. Kreibich. 1990. Antiribophorin antibodies inhibit the targeting to the ER membrane of ribosomes containing nascent secretory polypeptides. *J. Cell. Biol.* **111**(4):1335-1342.

- Zaaijer, H. L., D. S. Vallari, M. Cunningham, R. Lesniewski, H. W. Reesink, C. L. van der Poel, and P. N. Lelie. 1994. E2 and NS5: new antigens for detection of hepatitis C virus antibodies. *J. Med. Virol.* **44**:395-397.
- Zapun, A., T. E. Creighton, P. J. Rowling, and R. B. Freedman. 1992. Folding in vitro of bovine pancreatic trypsin inhibitor in the presence of proteins of the endoplasmic reticulum. *Proteins.* **14**(1):10-15.
- Zapun, A., N. J. Darby, D. C. Tessier, M. Michalak, J. J. Bergeron, and D. Y. Thomas. 1998. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* **273**(11):6009-6012.
- 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.
- 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.

