

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM U966

Morphogenèse & Antigénicité du VIH et des virus des hépatites

THÈSE

présentée par :

Loïc ETIENNE

Soutenue le : **27 Novembre 2014**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François Rabelais de Tours**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

**Assemblage et sécrétion du virus de l'hépatite C :
Identification de dix résidus de la protéine de
capside importants pour optimiser la production
du virus *in vitro***

THÈSE dirigée par :

Dr Christophe HOURIOUX

Maître de conférences, HDR, Université François Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Dr Olivier LAMBERT

DR CNRS, HDR, Université Bordeaux 1

Dr Yves ROUILLE

DR CNRS, HDR, Institut Pasteur de Lille

JURY :

Dr Christophe HOURIOUX

Maître de conférences, HDR, Université François Rabelais de Tours

Dr Olivier LAMBERT

DR CNRS, HDR, Université Bordeaux 1

Dr Hervé LERAT

Ingénieur de Recherche, HDR, Université de Paris-Est Créteil

Dr Yves ROUILLE

DR CNRS, HDR, Institut Pasteur de Lille

Pr Antoine TOUZE

Professeur, HDR, Université François Rabelais de Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude au Dr Christophe Hourieux pour avoir dirigé mes travaux de thèse durant ces 4 années. Merci pour tes conseils, ta patience et ta volonté de me faire progresser continuellement. J'ai beaucoup appris à tes cotés et sors de ce doctorat avec bien plus de connaissances et savoir faire. Je te suis également très reconnaissant de m'avoir fait partager tes impressions et encore une fois tes conseils concernant la suite de mon doctorat.

Un grand merci au Pr Philippe Roingeard, le premier à m'avoir donné ma chance dans le monde de la recherche avec ce stage de Master 1 en 2008. Même si j'ai mis plus d'un an avant de te tutoyer (!), tu as toujours été disponible et prompt aux discussions aussi bien dans le cadre de la recherche que lors des réunions pour l'école doctorale. Merci pour ta bienveillance générale.

J'adresse mes très sincères remerciements aux Drs Yves Rouillé et Olivier Lambert pour le regard et le travail qu'ils porteront à mes travaux de thèse ainsi qu'au temps consacré à ceci. Je remercie aussi vivement le Dr Hervé Lerat et le Pr Antoine Touzé d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. C'est avec un grand intérêt que j'attends de discuter avec vous tous de ce travail.

Il y a deux personnes maintenant que je souhaiterais mettre en avant, sans qui cette thèse ne se serait peut-être pas passée de la même façon ! Merci tout d'abord à Audrey ! La seule, l'unique ! Je crois avoir eu une excellente idée en te « conseillant » ce stage de M2 au labo... merci pour tout, les « cafés », les discussions du Lundi matin, les afterworks, de m'avoir fait tant rire aux doctoriales etc... Mais surtout d'avoir été là dans les moments un peu moins faciles. Et merci à Julien ! Le meilleur des ingénieurs ! Merci pour ton amitié tout simplement, tous ces repas du midi et nos discussions geek, nos soirées et we à vadrouiller... je remercie quand même Christelle de t'avoir un peu prêté ! Vous allez tous beaucoup me manquer mais nous nous reverrons j'en suis sûr.

Merci à tous les membres de l'unité U966 anciens ou présents ! Pauline pour avoir été ma première encadrante (j'en ris encore), que de bons souvenirs pour cette première expérience dans un labo ! Jean-Christophe Meunier, mon ancien collègue de bureau, merci pour toutes tes astuces, conseils et pour nos concours de dessins. Merci au gars Romu, toujours de bonne humeur et prêt à mettre l'ambiance, mais aussi capable d'écouter mes petits problèmes. Merci à Maman Amélie pour toutes nos petites discussions, on continuera nos « points infos » par mail avec Audrey ! Merci également à Claire la M1 porte bonheur et Damien pour ces quelques mois à travailler ensemble. Dans un désordre le plus complet merci aux petites et grandes Manue, Alain, Elodie (merci pour tes conseils de manips et pour nos longues conversations), Denys, Eric, Jean-Christophe Pagès, Francis, Martine, Anthony, Catherine, Alain Goudeau, Marion et Marion, Mélanie, Virginie, Suzie, Vincent : vous m'avez tous apporté quelque chose à un moment donné : une aide, un avis, une écoute ... merci à vous tous.

Un mot également pour l'équipe de microscopie ! Isabelle, Claude, Marie, Juliette, Fabienne, Sonia, Monique, Christine, Brigitte, Pierre-Yves, Pierre-Yvan, Rustem. Ca a été un plaisir de passer autant de temps avec vous, depuis si longtemps maintenant !

Merci à tous les copains: Alice, Catherine, Alexandre, Alexia, Maxime, Virginie, Julien, les Camille, Geoffrey, Silvère (oui toi aussi), Sébastien, Sophie, Anne-flore, Nolwenn, Coralie, Jérôme et tous les membres de l'ADOCT... j'en oublie sûrement mais vous vous reconnaitrez !

Et pour finir, merci à ma famille. Merci à mes parents pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci de votre patience et merci de m'avoir supporté lors de mes coups de blues, vous étiez parmi les seuls à les comprendre et vous l'avez très bien fait, sans vous tout ceci aurait été plus compliqué. Merci à ma frangine et nos lonnnnnngues conversations téléphoniques ! Merci à tout le reste de ma famille. Merci à ma grand-mère, la première à m'avoir vu « à faire des expériences dans un labo » et à m'avoir soutenu dans mes études, tu me manqueras lors de ma soutenance.

Résumé

Identifié en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) a longtemps été difficile à étudier faute de modèle *in vitro* satisfaisant. La mise au point en 2005 d'un modèle de propagation sur lignée d'hépatocarcinome (cellules Huh7) basé sur la souche hautement répliquative JFH-1 fut une formidable opportunité d'étudier les différentes étapes du cycle infectieux. Dans un premier temps, nos travaux ont consisté à tenter de comprendre les propriétés tout à fait particulières de cette souche en cherchant à identifier des ORFs potentiellement présentes sur le brin négatif de l'ARN viral. Un des objectifs a été de mettre en évidence leur expression potentielle dans le cycle de réplication de cette souche, parallèlement, ces ORFs ont également été clonées et exprimées isolément en culture cellulaire. L'utilisation des protéines produites dans des tests ELISA « maison » n'a pas permis la détection d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines, dans une cohorte de sérum de patients infectés par le VHC. De même, l'insertion de mutations dans la séquence du brin négatif de JFH-1, dans le but d'abolir l'expression de ces ORFs spécifiques à cette souche, ne semble pas perturber le déroulement du cycle viral, soulignant leur présence probablement fortuite dans la souche JFH-1. Dans leur ensemble, ces expériences n'ont pas permis de définir un rôle particulier pour ces ORFs présentes sur le brin négatif de l'ARN du virus de l'hépatite C.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité étudier les étapes de morphogenèse et de sécrétion du virus, des phases du cycle viral qui sont largement peu connues encore aujourd'hui, mais où la protéine de capsid joue probablement un rôle majeur dans l'initiation de ces mécanismes. En particulier, dans le cas de la souche JFH-1, plusieurs études ont relevé que cette protéine de capsid était responsable de la faible production de virus sur lignées cellulaires, suggérant que cette protéine était partiellement déficiente dans les phases d'assemblage du virus. Des études comparatives des séquences de capsides de différentes souches du virus de l'hépatite C nous ont permis de mettre en évidence 10 résidus spécifiques à la souche JFH-1 qui pourraient expliquer les déficits fonctionnels de cette protéine. En effet, le remplacement de ces 10 résidus par ceux plus communément retrouvés dans les souches de génotype 1 et 2 ont permis d'augmenter les titres infectieux intra et extracellulaires par rapport au génome JFH-1 sauvage d'environ 1,5 Log₁₀. Le niveau de réplication de l'ARN viral n'étant pas augmenté, nos résultats suggèrent que ces 10 résidus interviennent directement dans l'assemblage et la sécrétion de nouvelles particules infectieuses. La réalisation d'analyses en

microscopie confocale montre également que pour notre mutant, l'assemblage du virus pourrait être localisé au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, sans nécessité d'un trafic de la protéine de capsid à la surface des gouttelettes lipidiques, une hypothèse jusque-là admise avec la protéine de capsid sauvage de la souche JFH-1. Finalement, ces résultats montrent que la protéine de capsid du virus JFH-1 possède une séquence tout à fait singulière, en comparaison des nombreuses séquences publiées à ce jour, ces spécificités pourraient expliquer ses propriétés déficientes pour l'assemblage et la sécrétion de virus, à l'image de nos travaux montrant qu'une protéine de capsid de séquence proche des celles isolées chez les patients permet l'obtention *in vitro* de titres infectieux élevés. La mise au point de ce virus optimisé pourrait par ailleurs permettre de mieux comprendre la structure du virus, en particulier par purification et observation en microscopie électronique des particules virales générées ; ce type d'étude n'ayant pas pu être véritablement menée jusqu'à présent, en raison des titres infectieux trop faibles en présence de la souche JFH-1 d'origine.

Résumé en anglais

Since its discovery in 1989, study of the hepatitis C virus (HCV) was entraved for a long time by the lack of an efficient *in vitro* propagation model. Development and cloning in 2005 of the highly replicative strain JFH-1 was a great opportunity to study the different stages of the infectious cycle as this strain easily propagate in the hepatocellular carcinoma cell line (Huh 7 cells). Our objectives were to identify specific properties of this strain that are responsible of its *in vitro* propagation. After screening of the negative strand of viral RNA, we identified several ORFs, which could potentially account for replication properties of the JFH-1 strain. Thus, each identified ORFs was expressed and purified from cell lysates and then used in homemade ELISAs to screen a cohort of serum from infected or non infected patients for presence of specific antibodies. Unfortunately, we don't detected such antibodies, suggesting that ORFs were not expressed in the context of HCV natural infection. Similarly, insertion of mutations in these ORFs in order to abolish their potential expression showed no significative effect on viral cycle efficacy, suggesting that presence of these ORFs is probably fortuitous in the JFH-1 strain. Taken together, this initial set of experiments has not permitted identification of a role for these ORFs that seems to be not expressed both in JFH-1 and in infected patients. The second part of this work has been devoted to the *in vitro* study of morphogenesis and secretion of the virus. Until now, the late phases of particles assembly remain poorly understood, although the core protein is thought to probably play a major role in initiation of these mechanisms. In the case of the JFH-1 strain, several studies have demonstrated that this protein was responsible for low virus production on cell lines, suggesting that this protein could be partially deficient in the virus assembly phases. Comparative studies of the core sequences of different strains of hepatitis C have allowed us to identify 10 specific residues in the JFH-1 strain that may explain functional deficits of this protein. Replacement in JFH-1 strain of these 10 residues by those most commonly found in strains of genotype 1 and 2 showed a substantial increase in intracellular and extracellular infectivities titers (by a factor of 1,5 Log₁₀) compared with parental JFH-1 RNA. These results suggest that These 10 residues are directly involved in the assembly and secretion of new infectious particles, since intracellular replication of viral RNAs remained unchanged between mutated core JFH-1 construction and wild type JFH-1 strain. Moreover, as suggested by confocal microscopy analysis, assembly of our mutant seems to occur at endoplasmic reticulum membranes, with the observation that core protein doesn't traffic at the droplets lipid surface. This greatly contrast with the current accepted model for HCV morphogenesis that involve lipid droplets as an essential organelle for early phase of core

multimerization around newly synthesized HCV RNA. Finally, these results show that the JFH-1 core protein bears 10 singular residues in its sequence that may explain its relative deficiency in assembly and secretion of virus. In addition, replacement of these ten residues by most common amino acid found in patients show a great enhancement of *in vitro* virus production and secretion. As a perspective, development of this optimized virus could also represent a valuable model to determine the viral structure, and to precise the site of viral assembly; two HCV related fields that remain till now largely unknown.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Table des matières	9
Liste des Tableaux	13
Liste des figures	14
Introduction	17
I. Introduction	19
A. Généralités	19
1) Epidémiologie	19
2) Classification	20
3) Variabilité génomique et répartition géographique	22
4) Pathogenèse de l'infection	24
5) Modes de transmission	27
6) Traitements	28
7) Approches vaccinales	31
B. Organisation du VHC	33
1) Particules virales	33
2) Organisation du génome	36
3) Protéines virales	37
C. Modèles d'études du cycle infectieux du virus de l'hépatite C	49
1) Le réplicon sous-génomique	50
2) Le système dérivé du virus de la forêt de Semliki	51
3) Utilisation de Pseudo-Particules virales (VHCpp)	52
4) Le système VHCcc	53
5) Construction chimérique	54
6) Modèle d'infection de cultures primaires d'hépatocytes humains	56
D. Le cycle infectieux	56
1) L'entrée virale	56
2) Transmission Cellules-Cellules	59
3) Traduction du génome	60
4) Réplication du génome	61
5) Assemblage de la particule	62

Matériels et Méthodes	69
II. Matériels et Méthodes	71
A. Prédiction Bio-informatique.....	71
1) Analyses effectuées dans le cadre du Projet n°2	71
2) Analyses effectuées dans le cadre du Projet n°3	71
B. Plasmides.....	72
1) Production de protéines à l'aide du vecteur d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki (Commun aux trois projets)	72
2) Plasmides codant les ADNc des ARNs du VHC (Commun aux trois projets)	79
C. Transcriptions <i>in vitro</i> (Commun aux trois projets).....	82
1) pSFV1.....	82
2) Génomes viraux.....	83
D. Transfection par électroporation (Commun aux trois projets)	83
E. Culture cellulaire (Commun aux trois projets).....	84
1) Cellules Huh 7.5.....	84
2) Cellules BHK-21	84
3) Cellules FLC4	84
F. Analyse de l'expression protéique	85
1) Immunocytochimie.....	85
2) Western-blotting et immuno-empreinte	85
3) Microscopie électronique à transmission	86
4) Dosage de la protéine de capsid (Lié au projet n°3).....	86
G. Evaluation des titres infectieux (Lié au projet n°3).....	87
H. Quantification de l'ARN viral (Commun aux trois projets)	87
I. Test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Lié au projet n°2)	88
Résultats	89
Projet n°1 : Application de nouvelles techniques d'imagerie cellulaire à l'étude des mécanismes gouvernant la morphogenèse du virus de l'hépatite C	91
III. Résultats	94
A. Elaboration de séquences de capsides taguées	94
1) Séquences de capsides taguées à la GFP	95
2) Séquences de capsides taguées au FlAsH/ReAsH	95
B. Etude de l'expression des séquences de capsides taguées dans le système SFV	96

1) Contrôle de l'expression protéique par immunocytochimie	96
2) Colocalisation des protéines de capsides avec les gouttelettes lipidiques	97
3) Analyse de l'expression des constructions de capside en microscopie électronique ...	98
C. Elaboration d'un génome JFH-1 bicistronique	104
D. Expression du génome JFH-1 bicistronique en cellules Huh 7.5.....	105
Projet n°2 : Etude de protéines potentiellement codées par l'ARN négatif du virus de l'hépatite C	107
A. Analyse bio-informatique des ORFs présents dans l'ARN (-) du VHC	110
1) Analyse des ORFs du génotype 1	110
2) Analyse <i>in silico</i> du clone JFH-1 et des séquences de génotype 2	114
B. Expression des ORFs dans le système SFV	118
1) Synthèse des différentes constructions.....	118
2) Vérification de l'expression protéique en immunocytochimie	119
3) Vérification de l'expression protéique par Western Blot.....	120
C. Recherche d'anticorps dirigés contre les protéines codées par les ORF2 et ORFc chez les patients infectés : mise au point d'un test ELISA spécifique	121
1) Elaboration du test ELISA avec les lysats cellulaires	121
2) Réalisation des tests ELISA sur les sérums de patients	123
D. Expression d'un génome JFH-1 déficient pour la production de la protéine codée par la séquence de l'ORF 2	126
Projet n°3 : Etude de résidus de la protéine de capside impliqués dans les mécanismes d'assemblage et de sécrétion du virus	127
A. Analyses de séquences	130
B. Expression de la protéine de capside S8/JFH-1 à l'aide du système SFV	132
1) Analyse en microscopie confocale	132
2) Analyse en microscopie électronique.....	134
C. Expression et étude du génome complet S8/JFH-1.....	137
D. Analyse des interactions de la protéine de capside avec les composants viraux et cellulaires	142
Discussion	147
IV. Discussion	149
Conclusion et perspectives	161
V. Conclusion et perspectives	163

Bibliographie.....	167
Résumé	209
Résumé en anglais	209

Liste des Tableaux

Tableau I : Résidus de la protéine de capsid montrés comme impliqués dans la formation de particules virales.....	42
Tableau II: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines de capsid taguées, en système SFV	75
Tableau III: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines de capsid taguées en système JFH-1	76
Tableau IV: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines d'intérêts taguées en système SFV	78
Tableau V: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse de la protéine de capsid S8, en système SFV	79
Tableau VI: Séquences des amorces nécessaires à l'élaboration de la cassette Core1/Ires/Core2	80
Tableau VII: Séquences des amorces nécessaires à l'élaboration du génome JFH- 1/3STOP.ORF2	81

Liste des figures

Figure 1. Prévalence de l'hépatite C (%) en 2010.....	20
Figure 2. Arbre phylogénétique de la famille des <i>Flaviviridae</i> et division en quatre genres ..	22
Figure 3. Prévalence du VHC dans le mode et répartition génotypique	24
Figure 4. Représentation schématique des profils sériques potentiellement observés (Titres viraux, activités des transaminases ALAT et anticorps anti-VHC) dans le cas d'une infection au VHC	25
Figure 5. Evolution naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C.....	27
Figure 6. Schémas thérapeutiques recommandés en France en fonction des différents génotypes rencontrés chez les patients atteints de cirrhose ou fibrose avancée.....	30
Figure 7. Tableau récapitulatif des différentes approches pour le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC.....	32
Figure 8. Ultrastructure de virions HCV tagués et détection de protéines virales et cellulaires présentes à leur surface	33
Figure 9. (A) Lipo-viro-particules et (B, C, D) schémas des modèles d'association des particules virales aux VLDL.....	35
Figure 10. Organisation génomique et structure des régions 5' et 3' UTR	37
Figure 11. Structure des protéines du virus de l'hépatite C	37
Figure 12. Maturation de la protéine Core	40
Figure 13. Interaction de la protéine de capsid du VHC avec les gouttelettes lipidiques	41
Figure 14. Conformation des glycoprotéines acquise après traduction	44
Figure 15. Modèle d'un réplicon sous-génomique.....	51
Figure 16. Expression des protéines structurales du VHC à l'aide du vecteur SFV.....	52
Figure 17. Systèmes de culture cellulaire du VHC	55
Figure 18. L'entrée virale.....	59
Figure 19. Formation du complexe d'initiation 80S	60
Figure 20. Le « Membranous Web ».....	62
Figure 21. Modèle de la morphogénèse des lipo-viro-particules	66
Figure 22. Représentation des séquences de capsides taguées et des amorces utilisées pour leur conception	76
Figure 23. Représentation schématique des gènes de capsides taguées conçus.....	96

Figure 24. Analyse par immunofluorescence (et fluorescence de la GFP pour les constructions fusionnées à la GFP) de l'expression des différentes protéines de capsidées transfectées .	97
Figure 25: Analyse en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des différentes protéines de capsidées et de la répartition des gouttelettes lipidiques (GL) dans les cellules FLC4.....	100
Figure 26. Micrographies électroniques de sections ultrafines de BHK-21 transfectées avec les différentes séquences de capsidées modifiées	102
Figure 27: Immunomarquage en microscopie électronique de la protéine de capsidées du VHC	104
Figure 28. Schéma du génome JFH-1 bicistronique généré pour l'étude	104
Figure 29. Graphique de synthèse restreint à la représentation de 50 séquences de l'ARN négatif issus de génotype 1.....	111
Figure 30. Représentation graphique de la fréquence (%) de présence d'ORFs analysée sur 943 séquences d'ARNs négatifs de génotype 1	111
Figure 31. Représentation des alignements de séquences protéiques codées par l'ORFb et l'ORFc des génotypes	113
Figure 32. Analyse des différentes ORFs, détectées et codées potentiellement par l'ARN (-) de JFH-1.	114
Figure 33. Représentation d'alignement de séquence protéique codée potentiellement par l'ORF2-2a-1, l'ORF2-2b, l'ORF2-2a-2 et fin de l'ORF2.....	117
Figure 34. Schéma des différentes constructions réalisées	118
Figure 35. Analyse par immunofluorescence de l'expression des différentes protéines transfectées.....	119
Figure 36. Analyse de l'expression des différentes protéines d'expression par western Blot	120
Figure 37. Graphique représentant la révélation des protéines exprimées en test ELISA	122
Figure 38. Détermination par test ELISA de la présence d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 et l'ORFc dans des sérums de patients.....	124
Figure 39. Détermination par test ELISA de la présence d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 et l'ORFc dans des sérums de patients atteint d'hépatocarcinome .	125
Figure 40. Résultats de l'analyse comparative de séquences de la protéine de capsidées du VHC	131
Figure 41. Analyse en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des différentes protéines de capsidées et de la répartition des gouttelettes lipidiques en cellules FLC4. .	133

Figure 42. Micrographies électroniques de sections ultrafines de cellules BHK-21 transfectées avec les différentes séquences de capsides étudiées	135
Figure 43. Immunomarquage en microscopie électronique de la protéine de capside du VHC	137
Figure 44. Représentation schématique des ARNs exprimés en cellules Huh 7.5.....	138
Figure 45. Quantification relative des ARNs intracellulaires	139
Figure 46. Analyse du surnageant infectieux des cellules exprimant nos 3 ARNs.....	140
Figure 47. Pourcentage de cellules positives au marquage de la protéine de capside	141
Figure 48. Détermination de l'infectivité intracellulaire.....	142
Figure 49: Localisation subcellulaire de protéines virales au sein de cellules Huh 7.5 exprimant les constructions JFH-1, FL-J6/JFH-1 et S8/JFH-1	146

Introduction

I. Introduction

Le terme « hépatite » désigne toute inflammation aiguë ou chronique du foie dont l'origine est potentiellement virale avec huit agents infectieux notés A à G connus à l'heure actuelle. Si l'une d'entre elle (hépatite A) est observée depuis l'antiquité avec les premières descriptions de jaunisses (Payen & Rongieres, 2002), l'hépatite C n'a été décrite que dans les années 1970 sous le terme d'hépatite « non-A , non-B » (NANB) en lien avec un virus transmissible par le sang (Feinstone *et al.*, 1975). Dès lors, plusieurs équipes de recherche travaillant sur le modèle d'infection du chimpanzé montrèrent des modifications des membranes de réticulum endoplasmique dans les cellules infectées. Par la suite, la présence d'une enveloppe virale a été caractérisée suite à l'inactivation du virus par chloroforme et une taille de l'agent infectieux de 45 à 60 nm de diamètre a été déterminée par filtration (Bradley *et al.*, 1985). Malgré ces découvertes, les tentatives classiques de culture *in vitro* et d'observation en microscopie électronique ne permettront pas d'identifier le virus. Celui-ci sera finalement caractérisé grâce à l'utilisation de techniques de biologie moléculaire révolutionnaires pour l'époque : les équipes des Drs Houghton et Bradley parvinrent à extraire puis cloner le génome viral présent dans les sérums de patients infectés permettant ainsi la découverte d'un ARN simple brin positif de 9600 bases, génome du virus nommé virus de l'hépatite C (Choo *et al.*, 1989)

A. Généralités

1) Epidémiologie

De nos jours, l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème majeur de santé publique. En effet, plus de 180 millions de personnes seraient infectées dans le monde (Mohd Hanafiah *et al.*, 2013) avec une incidence de 3 à 4 millions de personnes nouvellement infectées par an. La prévalence s'avère être très variable au niveau mondial, l'Europe présentant une prévalence faible de 1% contrairement à certains pays tels l'Egypte ou le Pakistan faisant face à des taux d'infection très élevés, respectivement de plus de 15% et 4,7% (Sievert *et al.*, 2011). L'infection est chronique dans environ 60% des cas et impliquée dans 27% des cirrhoses et dans 25% des cancers du foie à travers le monde (Alter, 2007).

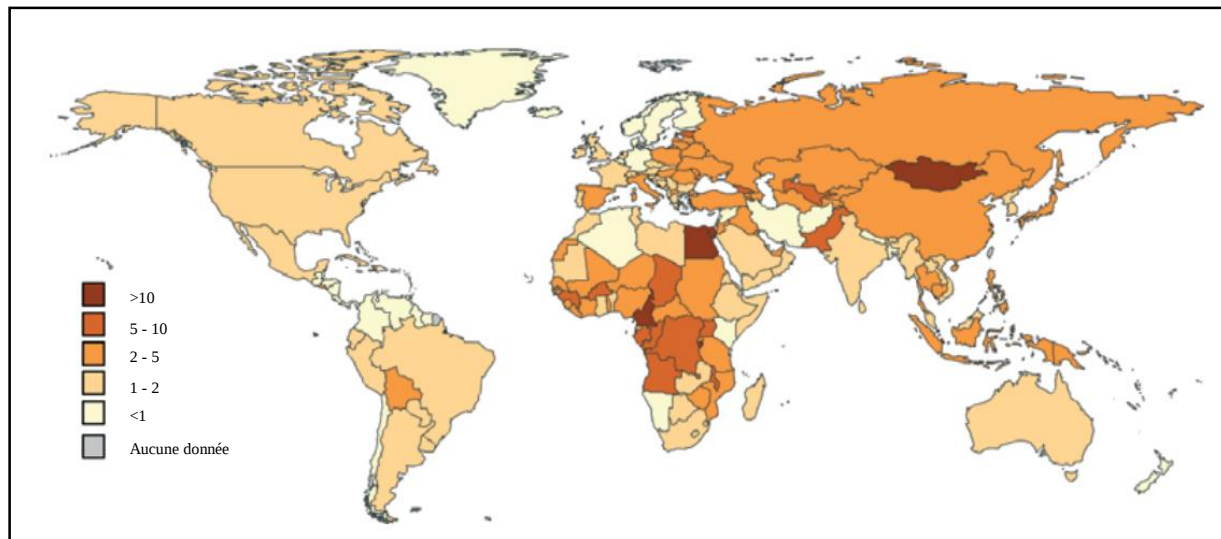


Figure 1. Prévalence de l'hépatite C (%) en 2010
(D'après Lavanchy, 2011)

En 2004, la prévalence des anticorps anti-VHC dans la population française a été estimée à 0.84% par l'InVS soit environ 370000 personnes séropositives. Si le sexe ne semble pas avoir d'incidence sur cette prévalence, celle-ci varie selon l'âge allant de 0.04% pour les 18-29 ans et 2.28% pour les 45-49 ans (Meffre *et al.*, 2010), une différence probablement expliquée par la découverte du virus en 1989 et la mise en place d'un dépistage automatique lors de dons du sang depuis mars 1990 qui amena à la diminution des infections par transfusions sanguines. Bien évidemment, cet écart va de pair avec une probabilité d'exposition au virus plus grande pour les populations plus âgées. Parmi la population séropositive, on retrouve 65% de porteurs de l'ARN viral soit une prévalence de 0.53% de l'infection chronique. Cependant, ces études se reposent principalement sur les analyses des donneurs de sang et excluent de fait les populations à risques dont le don de sang n'est pas autorisé. D'autre part, le caractère asymptomatique de la maladie rend d'autant plus difficile le dépistage de nouveaux cas et les études épidémiologiques de cette infection.

2) Classification

Virus enveloppé à ARN simple brin positif, le virus de l'hépatite C présente des similarités de structure, d'organisation génomique et de mode de réplication avec les agents de la famille des *Flaviviridae*, qui amenèrent à sa classification dans cette famille (Choo *et al.*, 1991) comprenant historiquement deux genres : celui des flavivirus (virus de la dengue, virus du Nil

occidental, virus de la fièvre jaune...) et celui des pestivirus (virus de la peste porcine, virus de la diarrhée bovine...). De par ses différences génétiques, le VHC fut à l'origine de la création d'un nouveau genre, celui des hépacivirus (Fauquet & Mayo, 2001) dont est devenu membre le virus GB de type B (GBV-B) un virus infectant les tamarins (*Saguinus labiatus*), des petits primates du Nouveau Monde (Thiel *et al.*, 2005). Plus récemment, un nouveau genre a été proposé au sein de cette famille virale : celui des pegivirus, qui comprendrait le virus GB de type A (GBV-A), le virus GB de type C (GBV-C) et celui de type D (GBV-D) (Stapleton *et al.*, 2011).

Le deuxième membre du genre hépacivirus, le GBV-B, a été découvert dans les années 60. En pleine recherche de l'agent responsable de l'hépatite « non-A, non-B », le sérum d'un chirurgien atteint d'une hépatite aigue soupçonnée NANB fut administré à des tamarins qui développèrent des troubles hépatiques (Deinhardt *et al.*, 1967). L'agent en cause fut nommé GB des initiales du chirurgien (George Baker) ayant donné son sérum. Le développement des techniques de biologie moléculaire permit d'identifier deux agents distincts dans le sérum de tamarins après plusieurs passages successifs de sérum GBV positifs chez des tamarins naïfs (Simons *et al.*, 1995). Constitués d'un génome de plus de 9 kb, ces virus furent nommés GBV-A et GBV-B, le virus de type A n'entraînant pas de troubles hépatiques le GBV-B fut mis en évidence comme l'agent responsable des hépatites chez le tamarin (Schlauder *et al.*, 1995 ; Bright *et al.*, 2004). L'organisation du GBV-B s'avère être proche du HCV structurellement malgré une homologie de séquence nucléotidique d'environ 28% (Muerhoff *et al.*, 1995), des motifs étant retrouvés conservés au sein de leurs régions 5' NC et de NS5A. Les deux virus ont donc logiquement été classés dans le même genre hépacivirus.

La recherche de virus proche du VHC dans d'autres populations animales a récemment permis la découverte d'un virus canin proche du VHC nommé CHV (*Canine Hepacivirus*) dont la séquence nucléotidique présente 50% d'homologie avec celle du VHC, le rendant plus proche du VHC que ne l'est le GBV-B. Si cette similarité lui permet d'être classé parmi les hépacivirus, le CHV est en revanche différent d'un point de vue physiopathologique, causant des syndromes respiratoires chez le chien (Kapoor *et al.*, 2011). Suite à cette découverte, l'équipe de Burbelo *et al.* utilisa un antigène dérivé de la région hélicase de la protéine NS3 du CHV pour tester la réponse immunitaire de différents animaux. De façon surprenante, 35% des sérums de chevaux testés répondirent positivement au test, certains d'entre eux possédant de l'ARN viral qui fut séquencé et s'avéra proche de la séquence du CHV (6,4% à 17,2% de divergence) (Burbelo *et*

al., 2012). Ces virus canins et équins sont maintenant regroupés sous le terme NPHV (*Non Primate Hepatitis Virus*), classés dans le genre hépacivirus (**Figure 2**) et ouvrent de nouveaux horizons quant à la découverte de nouveaux virus proches du VHC chez les animaux. En outre ces travaux pourraient permettre de développer de nouveaux modèles d'études pour le VHC.

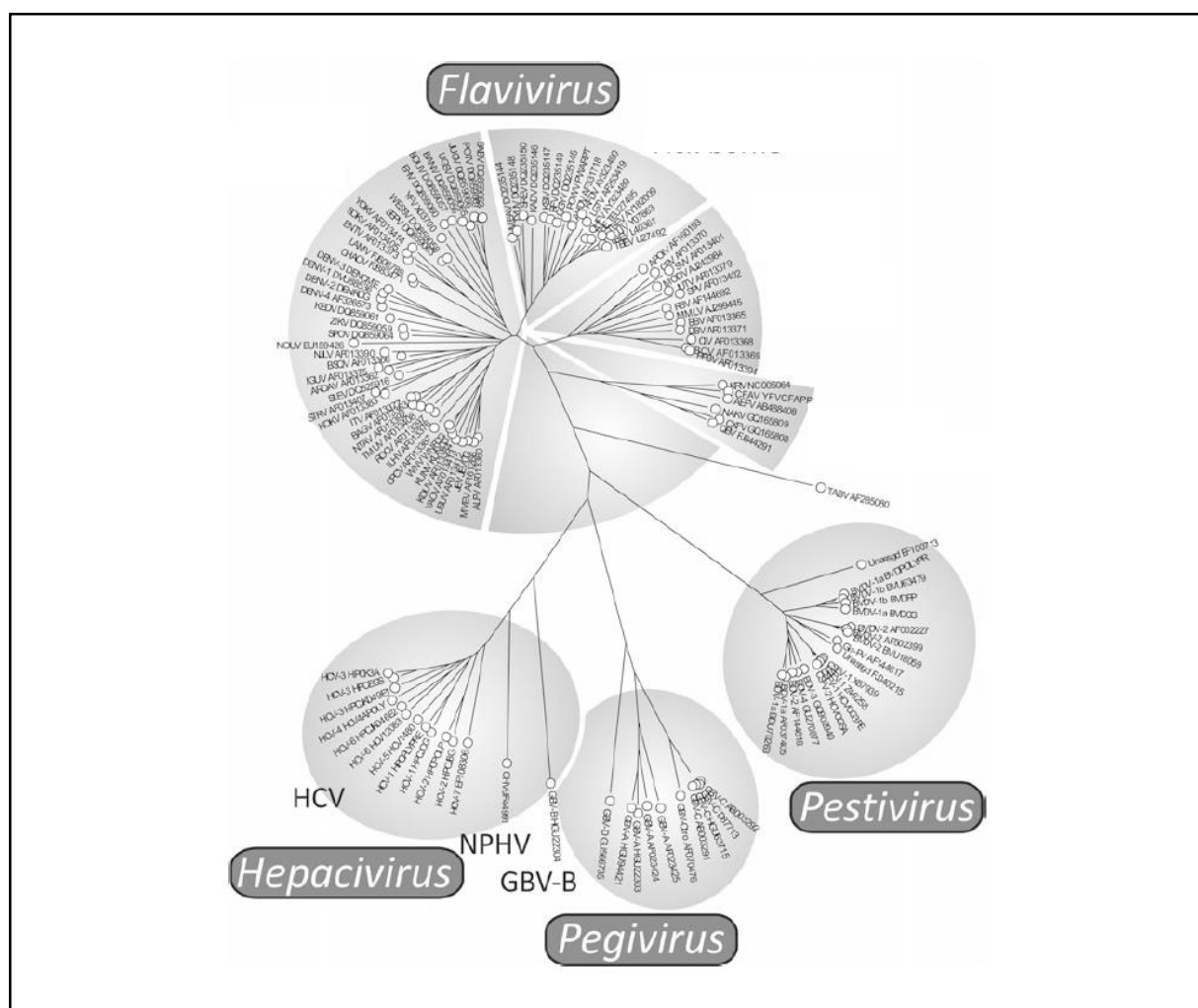


Figure 2. Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae* et division en quatre genres (D'après Bartenschlager, 2013)

3) Variabilité génomique et répartition géographique

Comme pour de nombreux virus à ARN, la présence d'une ARN polymérase ARN dépendante dépourvue d'activité correctrice couplée à un niveau élevé de réplication est responsable de l'apparition d'erreurs lors de la réplication de l'ARN viral, ce qui a abouti à l'émergence de

nombreux variants de virus de l'hépatite C au cours de son évolution. En 2005, un nouveau consensus a été créé à propos de la nomenclature à adopter pour classer l'ensemble des séquences décrites à ce jour, la diversité du VHC étant représentée par l'existence de 7 groupes phylogénétiques nommés « génotypes » de 1 à 7, chacun des membres d'un même génotype présentant des identités de séquences proche de 70%. Au sein de ces génotypes ont été déterminés des sous-types (ex : 1a, 1b etc...) dont les représentants partagent au minimum 80% d'homologie (Simmonds, 2004; Simmonds *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2014). Cette diversité génétique est retrouvée chez les patients avec l'établissement d'une population de quasi-espèces (90% d'homologie) propre à chaque individu infecté, résultant naturellement de l'accumulation des mutations lors de la réplication virale et de l'adaptation des virus à leur environnement.

Cette variabilité génétique va de pair avec une répartition géographique distincte (**Figure 3**). Le génotype 1 est retrouvé sur tous les continents, principalement en Occident et au Japon. En Afrique les génotypes 1 et 2 sont majoritaires, formant une vingtaine de variants signe de l'évolution d'une infection endémique probablement vieille de plusieurs siècles (Ruggieri *et al.*, 1996; Jeannel *et al.*, 1998). Le cas de l'Egypte est assez particulier : 15% de la population est atteinte par le génotype 4a du virus, signifiant une infection récente de la population. Des recherches ont incriminé la campagne de traitement anti bilharziose menée dans les années 1950 avec des anguilles non stérilisées ayant probablement répandu à large échelle le VHC (Pybus, 2003). Les génotypes 3, 5 et 6 sont respectivement décrits au Pakistan, Afrique du Sud et Asie du Sud Est (Mellor *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2008). Cette hétérogénéité génétique a un impact direct sur la progression de la maladie et représente un frein à la mise au point d'un vaccin. De plus, la distinction des génotypes affectant la population est indispensable puisque nécessaire à l'adaptation du traitement indiqué.

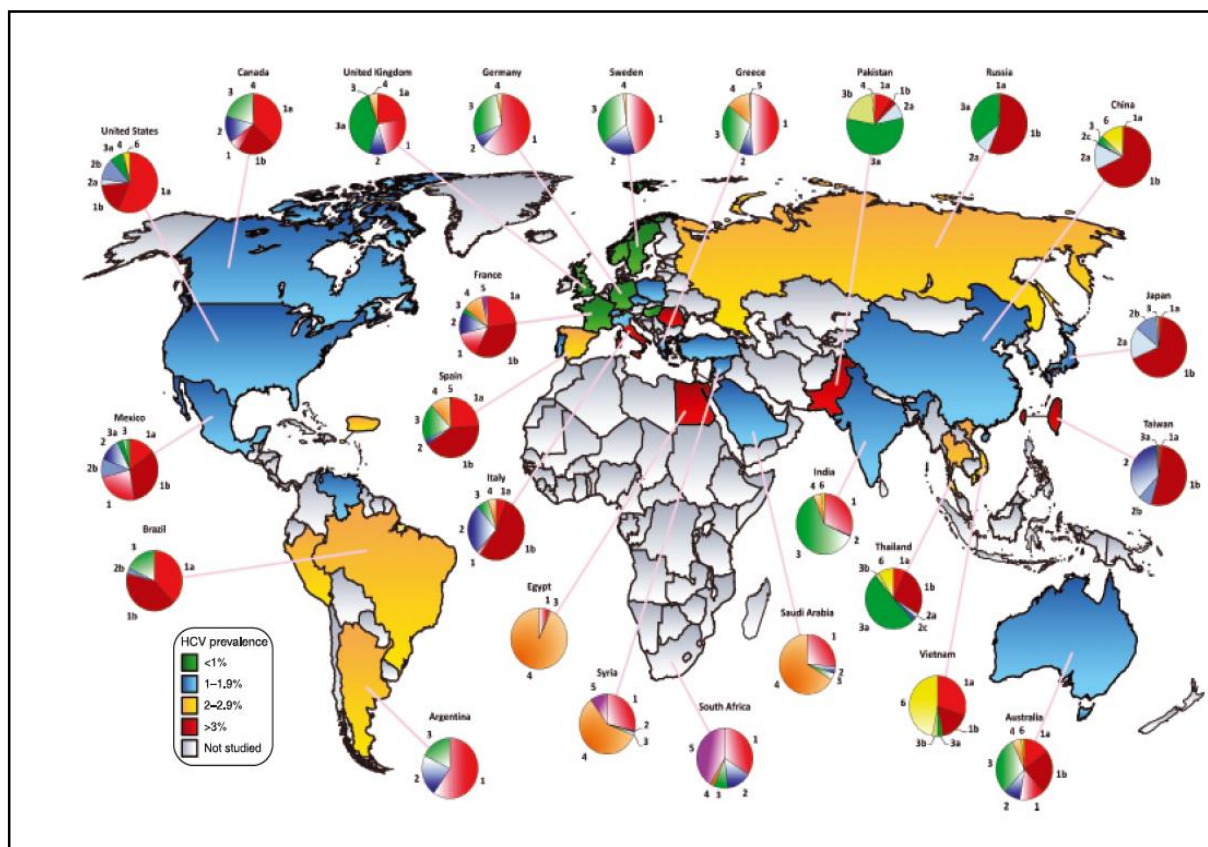


Figure 3. Prévalence du VHC dans le monde et répartition génotypique
(D'après Negro & Alberti, 2011)

4) Pathogenèse de l'infection

a) Phase aiguë

L'infection par le virus de l'hépatite C est constituée d'une première phase dite « aiguë » couvrant les 6 mois suivant la rencontre de l'agent infectieux. Si cette période est globalement asymptomatique, 20 à 25% des patients développent, durant les 3 premiers mois suivant l'infection, des signes cliniques caractéristiques de l'inflammation du foie tels des malaises, nausées, fièvre ou ictère cutéano-muqueux, aggravés par divers facteurs de morbidité (co-infection VIH ou VHB, alcoolisme).

Dès lors, une élévation du taux de transaminases sériques ASAT (Aspartate Amino Transférases) et ALAT (Alanine Amino Transférases) est observée entre 2 et 4 semaines après le contact avec le VHC. Localisées exclusivement (ALAT) ou majoritairement (ASAT) dans le cytosol des hépatocytes, leur présence dans la circulation sanguine est signe de l'inflammation du foie. Généralement, la détection des anticorps anti-VHC est effectuée par technique EIA (*Enzyme Immunosorbent Assay*) afin d'affirmer le diagnostic d'infection aiguë, ces derniers

apparaissant 20 à 150 jours après contamination. Le diagnostic est par la suite confirmé par recherche de l'ARN viral dans le sérum des patients, retrouvé dès le premier mois post-infection.

De très rares cas d'hépatites fulminantes induites par le VHC et entraînant la mort du patients dans les semaines suivants l'infection ont été décrites (Farci *et al.*, 2005), la plus connue étant l'hépatite fulminante provoquée par la souche dénommée JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1) utilisée depuis comme modèle d'étude (Wakita *et al.*, 2005).

Une guérison est possible lors de cette phase aigüe avec une élimination du virus par l'hôte (infection résolutive). L'ARN viral devient alors indétectable de façon durable, les niveaux de transaminases se normalisent et les anticorps anti-VHC diminuent tout en restant présents pendant plusieurs années (**Figure 4a**).

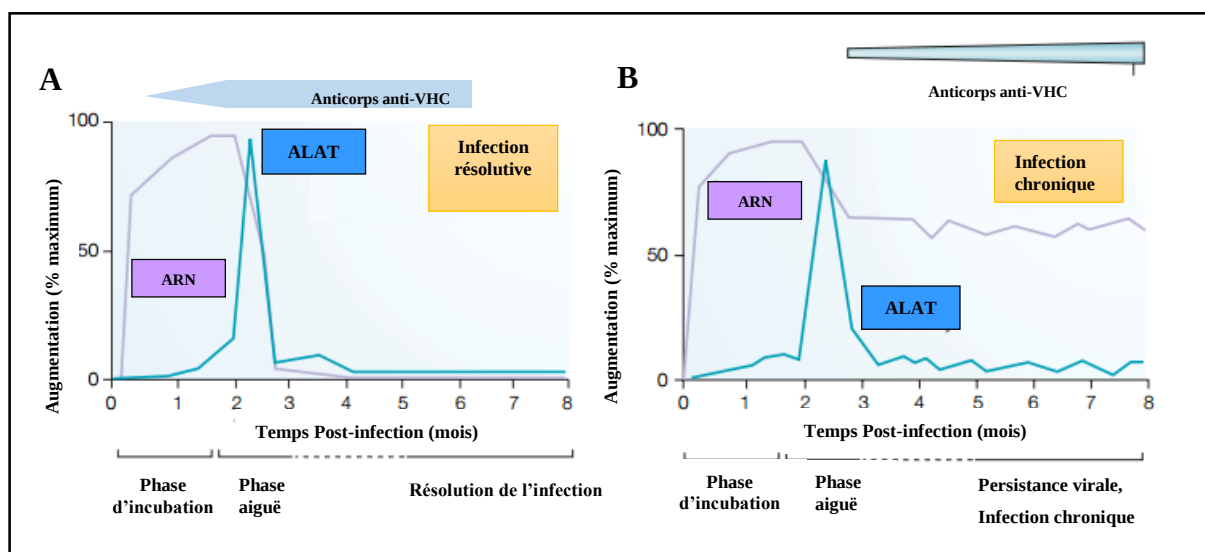


Figure 4. Représentation schématique des profils sériques potentiellement observés (Titres viraux, activités des transaminases ALAT et anticorps anti-VHC) dans le cas d'une infection au VHC (d'après Rehermann & Nascimbeni, 2005)

b) Phase chronique et manifestations cliniques

Cependant, 54 à 86% des infections sont persistantes plus de 6 mois après la contamination (Seeff, 2002), caractérisée par une charge virale maintenue et un niveau de transaminases modérément élevé (**Figure 4b**) (Rehermann & Nascimbeni, 2005). L'infection devenue alors chronique est cause de symptômes peu spécifiques (nausées, fatigue...) jusqu'à apparition au fil des années des premiers signes d'inflammation du foie tels des fibroses caractérisées par la production anormale de matrice extracellulaire. Les patients diagnostiqués font alors l'objet d'un suivi virologique et d'une analyse histo-pathologique d'une ponction hépatique qui permettra de définir le stade exact de l'infection et d'évaluer l'atteinte hépatique. Ces données sont exprimées grâce au score d'activité inflammatoire et de fibroses (score Métavir) : il dissocie l'activité inflammatoire (Score A de 0 à 3) et l'étendue de la fibrose (Score F de 0 à 4) (Bedossa & Poynard, 1996). Cependant, cette technique se voit progressivement remplacée par des approches non-invasives tel le FibroTest®, ne nécessitant qu'une prise de sang et identifiant des marqueurs directs ou indirects de fibrose (Imbert-Bismut *et al.*, 2001). Ces techniques présentent l'avantage d'être peu invasives, moins douloureuses et moins risquées pour le patient. Durant les 10 à 20 ans suivants la contamination, on estime à 20% le risque d'évolution de la fibrose en cirrhose chez les patients chroniquement infectés, entraînant une altération progressive de la structure du foie et une perte des fonctions hépatiques. Le risque d'une progression de la maladie vers un carcinome hépatocellulaire est alors de 1 à 4% par an (Lauer & Walker, 2001) (**Figure 5**).

La maladie peut suivre une progression plus rapide en présence de facteurs aggravant tels l'alcoolisme, l'âge, le sexe (la progression vers la cirrhose est 10 fois plus rapide pour les hommes) ou la co-infection avec le VIH ou VHB ou le génotype du VHC impliqué (Pour revue, Poynard *et al.*, 2005).

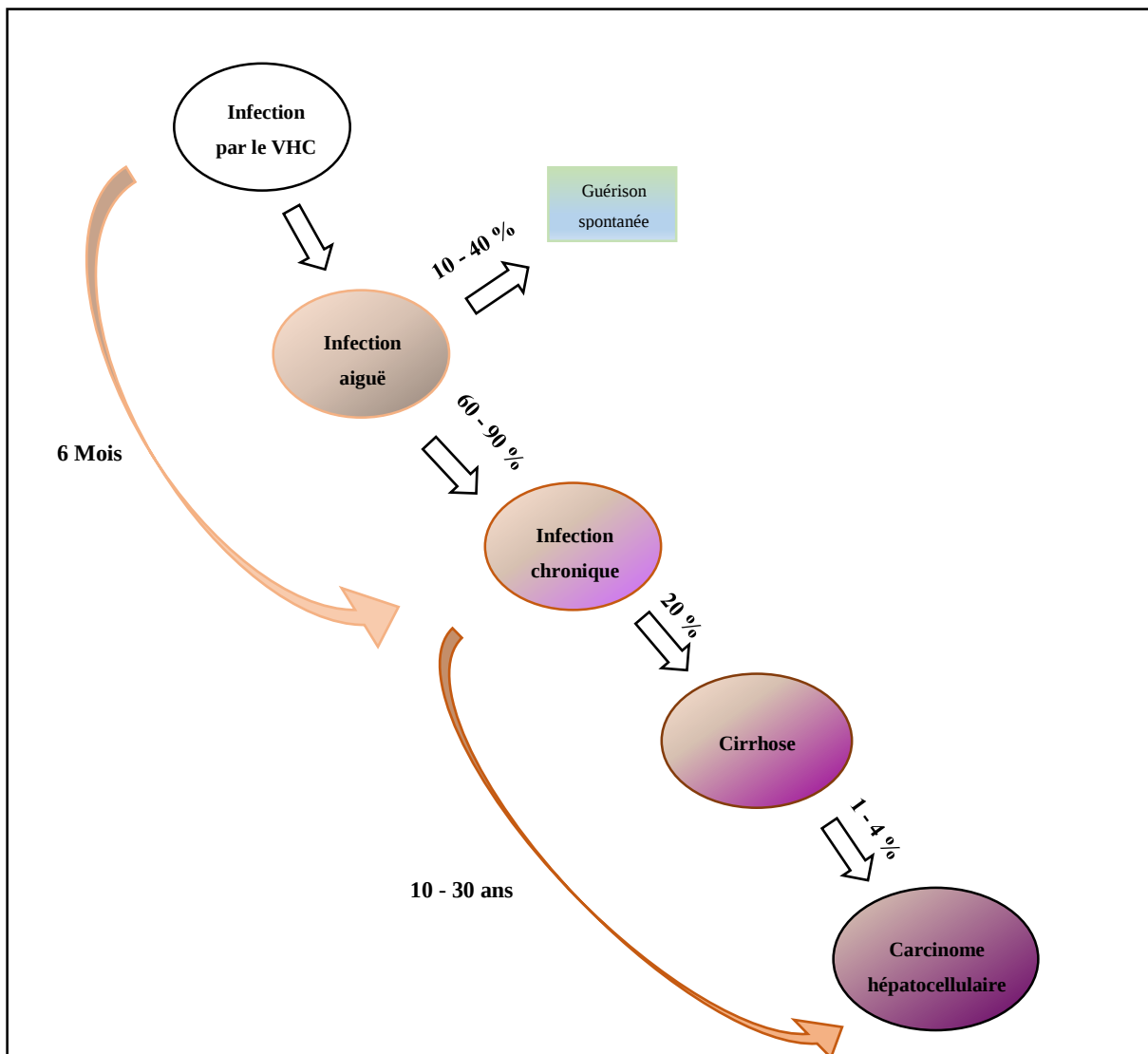


Figure 5. Evolution naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C
(Dixon & Crawford, 2007; Gailhouste *et al*, 2010)

5) Modes de transmission

Le virus de l'hépatite C se transmet principalement par voie parentérale, mode de transmission découvert dans les années 1970 avant même l'identification du virus (Prince *et al*, 1974). Avant la mise en place des tests de détection au début des années 1990 dans les pays industrialisés, la transmission pouvait s'effectuer lors de transfusions sanguines. Concernant les pays en développement, ce risque demeure toujours en l'absence de dépistage systématique des produits sanguins parfois transmis avec du matériel médical non stérile.

De nos jours, la transmission du VHC est majoritairement liée à la toxicomanie par voie intraveineuse et associée au partage fréquent de matériels souillés (seringues, cuillères, eau)

entre les utilisateurs, ceux-ci représentant 70% des nouveaux infectés par an en France (Chiffre INSERM, 2010). De par leur voie de contamination commune, la co-infection avec le VIH est fréquente dans ces populations à risque (14 à 19% des séropositifs VIH le sont pour le VHC, 54 à 63% des co-infectés sont des utilisateurs de drogue).

L'infection par voie sexuelle a été évoquée mais semble extrêmement faible comparée au virus sexuellement transmissibles que sont le VIH et le VHB. En revanche, la transmission mère-enfant est effective dans 4 à 7% des cas, lorsque l'ARN viral est détecté dans le sérum de la mère (Roberts & Yeung, 2002). Parallèlement à ces cas, le risque de contamination nosocomiale existe lors de l'utilisation de matériel hospitalier mal désinfecté (endoscope, piqueur pour glycémie) bien que l'amélioration des règles d'hygiène et l'utilisation de matériel à usage unique ait considérablement réduit ces risques. Concernant le personnel médical, le risque de contamination accidentelle par exposition au sang, bien que faible, nécessite une vigilance lors des soins fournis aux patients infectés.

Enfin, la pratique du tatouage ou du piercing dans des conditions d'asepsie non optimales est également une voie de contamination qui a été suggérée mais qui reste encore débattue (Hermansteyne *et al.*, 2012).

6) Traitements

Parmi les millions de patients atteints d'une hépatite C chronique, nombreux sont ceux qui développeront donc dans les décennies à venir un hépato-carcinome. De fait, la recherche de molécules thérapeutiques a été un enjeu majeur dès la découverte du virus.

Ces thérapeutiques ont pour objectif l'éradication virale, se traduisant dans la pratique par l'indéteçtabilité de l'ARN du VHC. Dénommée « Réponse Virologique Soutenue » (RVS), ce résultat est déterminé après 12 (RVS12) ou 24 (RVS24) semaines après traitement, le risque de rechute après cette période étant très rare (Maylin *et al.*, 2008).

La thérapie standard, utilisée au début des années 2000 et les 10 années qui suivirent, comprenait une combinaison d'interféron alpha pegylée (IFN α -peg) et de ribavirine administrée pendant 24 à 48 semaines. L'IFN α -peg stimule les mécanismes de défense antiviraux de la cellule, aboutissant par cascade de réactions à la production de protéines telles l'ARN kinase ARN-dépendante capable d'inhiber la traduction des protéines virales. En revanche, le rôle de la ribavirine est moins bien connu, il a été suggéré qu'elle pourrait être responsable de l'activation de la réponse immune T helper de type 1 qui augmente la production

d'IFN ou encore participer à l'inhibition de la polymérase virale (Feld & Hoofnagle, 2005). En revanche, si cette combinaison permet un taux de RVS d'environ 80% chez patients infectées par une souche de génotype 2 ou 3, elle est relativement moins efficace (<50% de guérison) dans les cas d'infection par une souche génotype 1, génotype majoritaire dans les pays occidentaux. L'origine ethnique semble également impliquée dans la probabilité de réponse aux thérapies, une étude ayant démontré une plus grande efficacité de l'IFN chez les patients américains caucasiens comparativement aux afro-américains (Reddy *et al.*, 1999). La mise en évidence, dix ans plus tard, de l'implication du polymorphisme du gène codant l'IL28B sur la réponse à la bithérapie permet d'expliquer en partie le poids du facteur ethnique : en effet, les patients ayant un génotype défavorable de l'IL28B (allèles rs12979860 CT ou TT, majoritaire chez les populations afro-américaines et afro-caribéennes) ont une probabilité plus élevée de ne pas répondre au traitement contrairement à ceux possédant le génotype CC du gène (plus fréquemment retrouvé dans les populations caucasiennes)(Ge *et al.*, 2009).

De plus, outre les patients non-répondeurs au traitement, cette thérapie est coûteuse et associée à des effets secondaires importants (dyspnée, fatigue, état dépressif, nausées...) amenant parfois à l'abandon de celle-ci.

Une importante avancée fut l'arrivée en 2011 sur le marché des inhibiteurs de protéases NS3-NS4A de première génération : le Télaprévir et le Bocéprévir (McHutchison *et al.*, 2009) (Kwo *et al.*, 2010). L'utilisation de l'une de ces molécules, en combinaison avec l'IFN α et à la ribavirine, a montré qu'elle permettait d'atteindre un taux de guérison voisin de 70% pour les infections à génotype 1. Néanmoins, ces molécules ont rapidement montré qu'elles étaient sensibles à l'apparition de résistance, par ailleurs cette trithérapie ne permet pas de s'affranchir des effets secondaires décrits précédemment.

De par son rôle direct dans la réplication virale et sa conservation de séquences entre génotypes, l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC (NS5B), a été une cible privilégiée pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Actuellement, l'un des principaux représentants de ces molécules est le sofosbuvir, un analogue nucléotidique efficace contre tous les génotypes et possédant une bonne barrière génétique de résistance (Asselah, 2014). Il s'agit un antiviral retrouvé dans la plupart des traitements administrés contre le VHC en France permettant d'atteindre 90% de RVS dans le cadre d'une trithérapie contre une infection génotype 1 (Lawitz *et al.*, 2013) (**Figure 6**).

En parallèle, l'utilisation de sofosvubir associé au siméprévir (inhibiteur de la protéase) a montré un taux de RVS de 91 % chez les patients non répondeurs à la bithérapie IFN-ribavirine et infectés pour une souche de génotype 1b (Lawitz *et al.*, 2014).

Les effets secondaires rencontrés lors de bithérapie ont encouragé le développement de traitement éliminant la combinaison IFN-peg / ribavirine, ouvrant la voie vers des stratégies vers des monothérapies efficaces dans un futur proche. Ainsi, des résultats encourageants ont été récemment publiés à propos du Daclatasvir (inhibiteur de la réplication ciblant NS5A), Asunaprévir (inhibiteur de la protéase) et BMS-791325 (inhibiteur non nucléosidique de la polymérase) contre des infections génotype 1, tout en démontrant une bonne tolérance globale et une RVS de 94% après 12 semaines de traitement (Everson *et al.*, 2014).

Combinaisons	Durée du traitement
Génotype 1	
Sofosbusir+interféron pégylé+ribavirine	12 semaines
Sofosbuvir+siméprévir (génotype 1b uniquement)	12 semaines
Sofosbuvir+daclatasvir	12 semaines
Génotype 2	
Sofosbuvir+ribavirine	12 semaines
Génotype 3	
Sofosbuvir+interféron pégylé+ribavirine	12 semaines
Sofosbuvir+ribavirine	24 semaines
Sofosbuvir+daclatasvir	24 semaines
Génotype 4	
Siméprévir+interféron pégylé+ribavirine	12 semaines
Sofosbuvir+ribavirine	24 semaines
Sofosbuvir+interféron pégylé+ribavirine, puis interféron pégylé+ribavirine	12 semaines/12 semaines
Génotypes 5-6	
Sofosbuvir+interféron pégylé+ ribavirine	12 semaines

Figure 6. Schémas thérapeutiques recommandés en France en fonction des différents génotypes rencontrés chez les patients atteints de cirrhose ou fibrose avancée

(Rapport sous l'égide de l'ANRS et de l'AFEF sur la « Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C », sous la direction du Pr Dhumeaux, 2014)

7) Approches vaccinales

En l'absence de vaccins contre l'infection au virus de l'hépatite C, les stratégies thérapeutiques décrites représentent la meilleure arme contre la maladie. Malheureusement, le coût important des traitements constitue un frein à l'accessibilité des thérapeutiques pour une majorité des personnes infectées dans le monde. Qui plus est, ils ne permettent pas d'éviter la contamination d'environ 4 millions de personnes saines par an, dont l'aspect asymptomatique de l'infection empêche la prise en charge médicale et peut engendrer une transmission à d'autres sujets sains. Le développement d'un vaccin prophylactique apparaît donc comme le meilleur espoir pour le contrôle de l'épidémie à l'échelle mondiale.

A l'heure actuelle, de nombreux vaccins préventifs sont en développement, s'appuyant en premier lieu sur le modèle d'étude du chimpanzé, seule espèce animale pouvant être contaminée par le VHC (Pour revue, Honegger *et al.*, 2014).

Les protéines d'enveloppe E1 et E2 sont principalement utilisées dans le but d'induire une réponse humorale permettant de neutraliser le virus. Dans ce contexte, un vaccin conçu à partir de protéine recombinantes E1 et E2 purifiées s'est avéré capable d'induire une réponse humorale significative chez l'homme en essai de phase 1, permettant même la neutralisation de plusieurs génotypes du VHC *in vitro* (Stamatakis *et al.*, 2011). Cependant, ces protéines d'enveloppe s'avèrent être difficiles à purifier de par leur ancrage aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) par l'intermédiaire de leur domaine transmembranaire (DTM), constituant un handicap majeur pour une adaptation à la production industrielle d'un tel vaccin (Forns *et al.*, 2002). Alternativement, la production de protéines E1 et E2 tronquées de leur DTM a été également envisagée pour permettre leur sécrétion facilitant de ce fait leur purification. Cependant, la suppression du DTM fait perdre leurs propriétés fonctionnelles et antigéniques, les rendant inaptes à l'élaboration d'un vaccin (Sominskaya *et al.*, 2006). L'utilisation de pseudoparticules non infectieuses présentant les glycoprotéines d'enveloppe dans leur conformation correcte (VHCpp) a été proposée. Difficile à produire en grande quantité et basée sur l'utilisation de particules rétrovirales murines nécessitant diverses validations avant utilisation sur l'Homme, cette stratégie s'avère également très complexe à mettre en place.

Dans ce contexte, notre laboratoire développe actuellement une stratégie vaccinale en utilisant comme support les propriétés du vaccin contre le virus de l'hépatite B, constitué de particules sous virales d'enveloppe. Ce dernier repose sur l'utilisation de la protéine majeure d'enveloppe

S particulièrement immunogène, présentant quatre DTM et capable de s'auto-assembler pour former des particules sous virales non infectieuses. Les travaux du Dr. Beaumont ont consisté à la mise au point de protéines chimériques, incluant les protéines E1 et E2 du VHC, fusionnées avec la partie N-terminale de la protéine S du VHB. De ce fait, ces protéines chimères ont la particularité d'être co-assemblées et secrétées en particules lorsqu'elles sont exprimées en présence de la protéine sauvage S. Les premiers tests effectués en modèle animal ont montré que ces protéines chimères sont immunogènes et permettent une production d'anticorps neutralisant différents génotypes *in vitro*, tout en induisant une réponse anti-VHB équivalente à celle induite par un vaccin commercial contre le VHB (Beaumont & Roingeard, 2013). Ces premiers résultats montrent ainsi qu'il sera probablement possible d'associer une protection à la fois contre le VHB et le VHC au sein d'un vaccin bivalent VHC-VHB, réduisant ainsi les coûts de production permettant une distribution plus large d'un vaccin contre ces deux virus.

Type of vaccine	Investigator	Lead author	Year	Vaccine	Tested in	Adjuvant
Recombinant protein	Innogenetics	Leroux-Roels	2004	Recombinant E1 (T2S-918/InnoVac-C)	Human n = 20	Alum
	Chiron/Novartis	Choo	1994	rE1E2	Chimpanzee n = 7	MF59
		Frey	2010	rE1E2	Human n = 60	MF59
	CSL Ltd.	Drane	2009	Recombinant Core	Human n = 30	ISCOMATRIX
	BPRC, Holland	Verstrepen	2011	Recombinant E1 or E2	Chimpanzee n = 4	Alum
Peptide	Intercell AG	Firbas	2006	7 HLA-A2 restricted peptides (IC41)	Human n = 128 (HLA-A2)	Poly-L-arginin
		Firbas	2010	7 HLA-A2 restricted peptides (IC41)	Human n = 54 (HLA-A2)	Poly-L-arginin
Virally vectored	Transgene Co.	Rollier	2007	DNA/MVA	Chimpanzee n = 4	-
	Okairos Co.	Folgori	2006	Ad6/Ad24 + electroporated DNA	Chimpanzee n = 5	-
	University of Oxford/Okairos	Fattori	2006	Ad6/Ad6/ChAd32	Rhesus macaque n = 3	-
		Barnes	2012	Ad6/ChAd3	Human n = 30	-
	NIH/Okairos Co.	Park	2012	Ad/DNA	Chimpanzee n = 5	-
	NYC blood center	Youn	2008	Recombinant vaccinia	Chimpanzee n = 4	-
Other	NIH	Elmowalid	2007	VLPs	Chimpanzee n = 4	AS01B

Ad: Adenovirus, numbers indicate type; ChAd: Adenoviruses of Chimpanzee origin; BPRC: Biomedical Primate Research Centre, Holland; DNA: Plasmids containing HCV genetic material; HLA-A2: Human leukocyte antigen serotype A2; n: Number of subjects used in study; rE1 or E2: Chimpanzees were vaccinated either with recombinant E1 protein or with recombinant E2 protein; rE1E2: Recombinant E1E2 heterodimer.

Figure 7. Tableau récapitulatif des différentes approches pour le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC (D'après Swadling *et al.*, 2013)

B. Organisation du VHC.

1) Particules virales

Malgré sa découverte du virus en 1989, les données concernant la structure du VHC demeurent largement mal connues. Les techniques classiques de microscopie électronique couramment employées n'ont en effet jamais permis la visualisation claire des virions sécrétés. Une des raisons de cet échec est probablement liée à la fragilité et à la dégradation des virions lors des protocoles de purification ainsi qu'au pléiomorphisme des particules rendant difficile l'identification certaine de la particule virale. Cependant, ces dernières années ont vu l'émergence des techniques d'immunocapture sur grilles de microscopie qui devraient permettre à l'avenir une analyse plus fine des particules produites *in vitro* (Catanese *et al.*, 2013; Piver *et al.*, 2014) (**Figure 8**).

Le modèle classiquement établi pour l'organisation des particules virales consiste en une nucléocapside à symétrie potentiellement icosaédrique formée à la suite de la multimérisation des protéines de capsid et contenant l'ARN viral monocaténaire. La nucléocapside est enveloppée par une membrane constituée d'une bicouche lipidique acquise lors de son bourgeonnement à travers la membrane du RE (Roingeard *et al.*, 2004) et dans laquelle sont enchâssés des dimères de protéines E1 et E2.

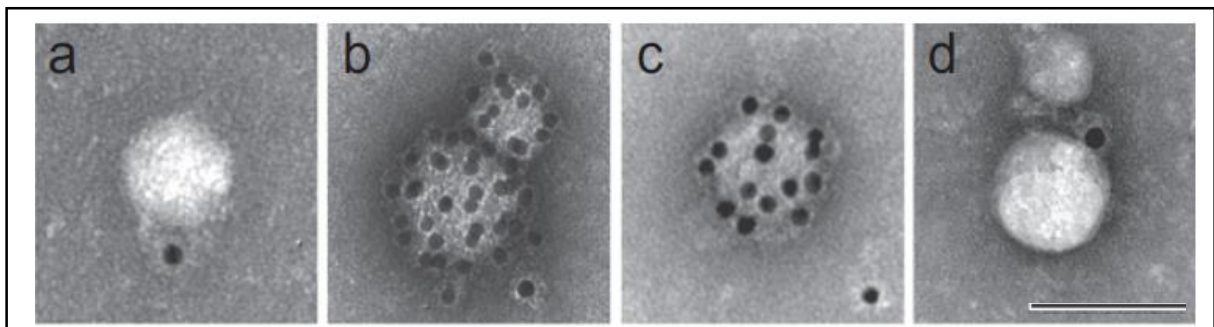


Figure 8. Ultrastructure de virions HCV tagués et détection de protéines virales et cellulaires présentes à leur surface (D'après Catanese *et al.*, 2013).

Images représentant des virions tagués 6xHis purifiés sur grilles traités par 2% de Ni-NTa (interagissant avec le tag 6xHis) et immunomarqués à l'aide d'anticorps anti-E2 (a) –apoE (b) –apoA-I (c) – apoB (d). (Barre d'échelle : 100 nm)

a) *In vivo*

Dans le sérum de patients infectés, les particules virales sont retrouvées avec une taille variant de 20 à 100 nm (Andre *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2005) et présentent également une hétérogénéité de densités comprises entre 1.03 et 1.25 g/mL (Thomssen *et al.*, 1992) après centrifugation en gradient de saccharose. Cette hétérogénéité de taille et de densité illustre probablement la diversité des formes circulantes de particules virales, tout en étant liée également à leur association avec des composants sériques et cellulaires (lipoprotéines, immunoglobulines).

En effet, les particules de faible densité, plus massives (100nm, **Figure 9A**), sont associées à des lipoprotéines de faible et très faible densité (LDL et VLDL) et de ce fait ont été qualifiées de lipo-viro-particules (LVP) (Andre *et al.*, 2002). Ce modèle LVP a depuis été confirmé par des expériences d'immunoprécipitation démontrant la présence d'apolipoprotéines à la surface des particules infectieuses *in vivo* telles ApoB, ApoE et ApoCI (Nielsen *et al.*, 2006; Meunier *et al.*, 2008). De plus, la densité des particules s'avère être inversement proportionnelle à leur infectiosité aussi bien *in vivo* (Bradley *et al.*, 1991) qu'*in vitro* (Lindenbach *et al.*, 2006), soulignant le rôle majeur des lipoprotéines à la surface du virus, dont la présence a été montré comme un élément indispensable à l'entrée virale (Agnello *et al.*, 1999; Wunschmann *et al.*, 2000). Cependant la question de la nature de l'association particule/VLDL est encore aujourd'hui mal comprise. Plusieurs modèles hypothétiques existent et consisteraient en l'association des particules et des lipoprotéines sériques par des interactions spécifiques protéines-protéines (**Figure 9B**) ou par une association partielle (**Figure 9C**) ou totale (**Figure 9D**) de leurs enveloppes (Lindenbach, 2013).

Concernant les particules retrouvées dans des fractions de plus forte densité (1,22 à 1,25 g/mL) en gradient de saccharose, elles correspondraient à des complexes capsides-anticorps ou des nucléocapsides non enveloppés de taille comprise entre 38 et 62 nm (Maillard *et al.*, 2001). Des particules virales enveloppées non associées aux lipoprotéines ont également été observées, d'une taille estimée entre 35 et 70 nm pour une densité comprises entre 1,12 et 1,21. Délipidées expérimentalement, elles conduisent à l'obtention de nucléocapsides non enveloppées proches de celles citées précédemment (Kanto *et al.*, 1994).

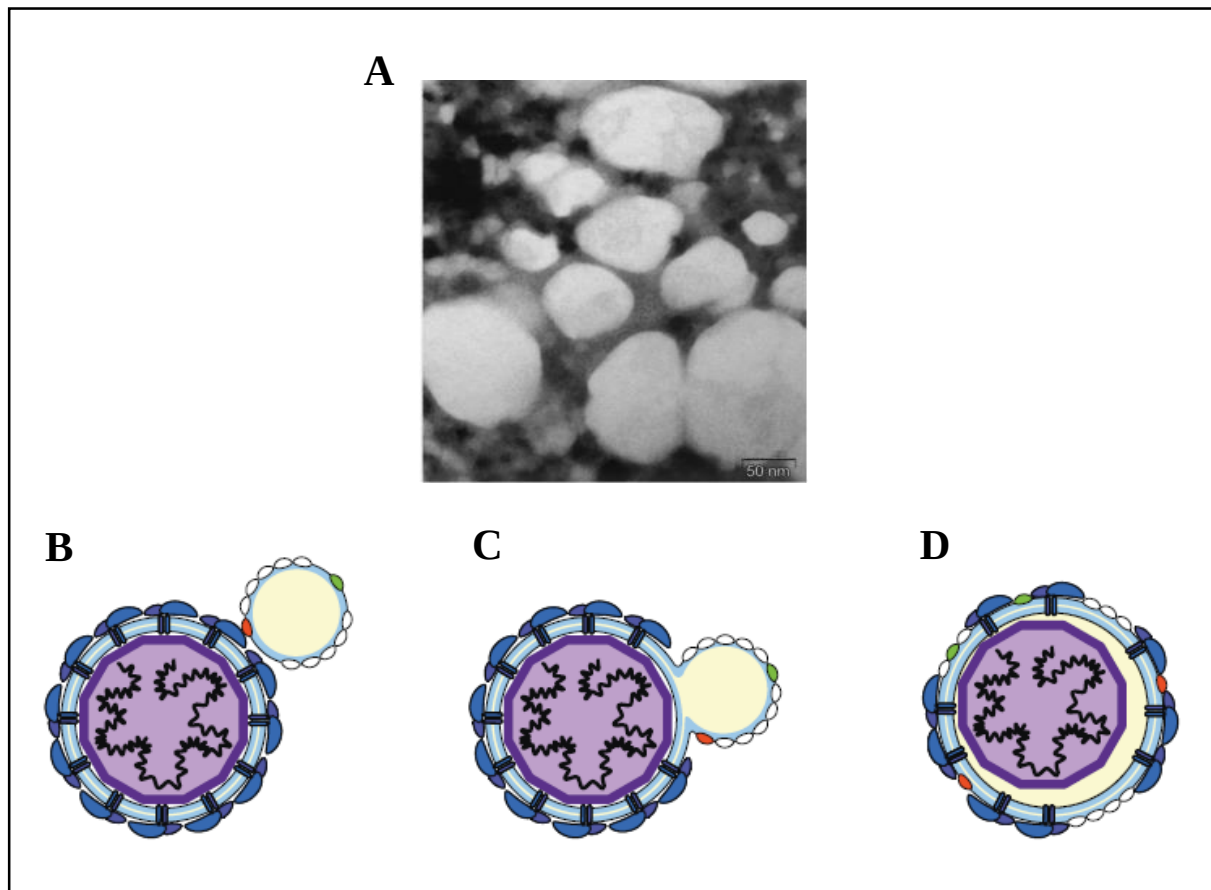


Figure 9. (A) Lipo-viro-particules et (B, C, D) schémas des modèles d'association des particules virales aux VLDL (D'après Andre *et al.*, 2002 et Lindenbach, 2013)

b) In vitro

La découverte de la souche JFH-1 en 2005, capable de modéliser un cycle viral complet *in vitro* (système HCVcc) a permis l'étude de particules virales sécrétées (Wakita *et al.*, 2005). Ces dernières présentent également une hétérogénéité de taille et de densité avec un diamètre compris entre 45 à 60 nm (Gastaminza *et al.*, 2010). Les analyses effectuées en gradient de densité ont montré que les particules de grand diamètre étaient retrouvées dans les fractions proches de 1,11 g/mL et caractérisée par une meilleure infectiosité comparativement aux populations de plus forte densité. Par ailleurs, l'immunocapture et l'immunoprécipitation de ces particules a permis de démontrer qu'elles contenaient les apoprotéines B et E à leur surface (Boyer *et al.*, 2014; Merz *et al.*, 2011). Bien que ces données laissent apparaître de fortes similarités entre les particules produites *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que le virus produit *in vitro*, utilisé pour infecter des modèles *in vivo* tels le chimpanzé ou la souris au foie immunisé (uPA-SCID), amenait à la production de particules de plus faible densité dans ces modèles animaux (Lindenbach *et al.*, 2006). Cela met en avant des différences dans le métabolisme

lipidique entre les lignées cellulaires et les modèles animaux utilisés, et démontre ainsi l'importance du choix du modèle lors de l'étude des particules infectieuses.

2) Organisation du génome

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9600 bases composé en deux régions 5' et 3' non codantes (NC) structurées et très conservées, ainsi que d'un long cadre de lecture ouverte codant une unique polyprotéine précurseur de 3000 acides aminés (**Figure 10C**).

La région 5' NC, longue de 341 nucléotides, est composée de quatre domaines structurés en tige boucle (Stem-Loop) bien distincts nommés SL I à IV, très conservés au sein des différents génotypes (**Figure 10A**). Les domaines SLII à IV, en plus des premiers nucléotides de la région codant la protéine de capsid, forment l'IRES qui permet l'initiation de la traduction de façon indépendante de la coiffe (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992). Quant aux domaines SLI et SL II, ils ont été démontrés comme indispensables pour la réplication de l'ARN viral (Friebe *et al.*, 2001). De plus, cette région 5'NC est la cible d'un miR endogène (miR-122) dont l'interaction avec cette région permet d'induire une augmentation de la réplication virale (Jopling, 2005). L'association entre le miR-122 et la région 5' NC protégerait en effet cette dernière contre la réponse immunitaire innée et contre l'action des nucléases cellulaires (Machlin *et al.*, 2011).

La partie codante de l'ARN viral présente un unique cadre de lecture ouverte dont la traduction donne naissance à une polyprotéine précurseur qui subira une série de clivages Co- et Post-traductionnels assurés par l'action combinée de protéases cellulaires et de deux protéases virales. Ceci conduit à la formation d'une part des protéines structurales (Protéine de capsid « core », E1, E2) et d'autre part des protéines non structurales (allant de p7 à NS5B) (Lohmann & Bartenschlager, 2013) (**Figure 10C**).

Longue de 200 à 235 nucléotides, la région 3'NC est constituée de trois domaines : une région de longueur variable directement en aval du codon stop, une région poly (U-UC) variable en longueur selon les souches virale (Tanaka *et al.*, 1996) et un domaine très conservé de 98 nucléotides nommée « 3'X » contenant les domaines SL1, SL2, et SL3 (Kolykhalov *et al.*, 1996) (**Figure 10B**). Le variation de longueur du segment poly(U/UC) a un impact direct sur le niveau de réplication de l'ARN viral (Friebe & Bartenschlager, 2002), mécanisme dans lequel la région 3'X intervient également (Yi & Lemon, 2003).

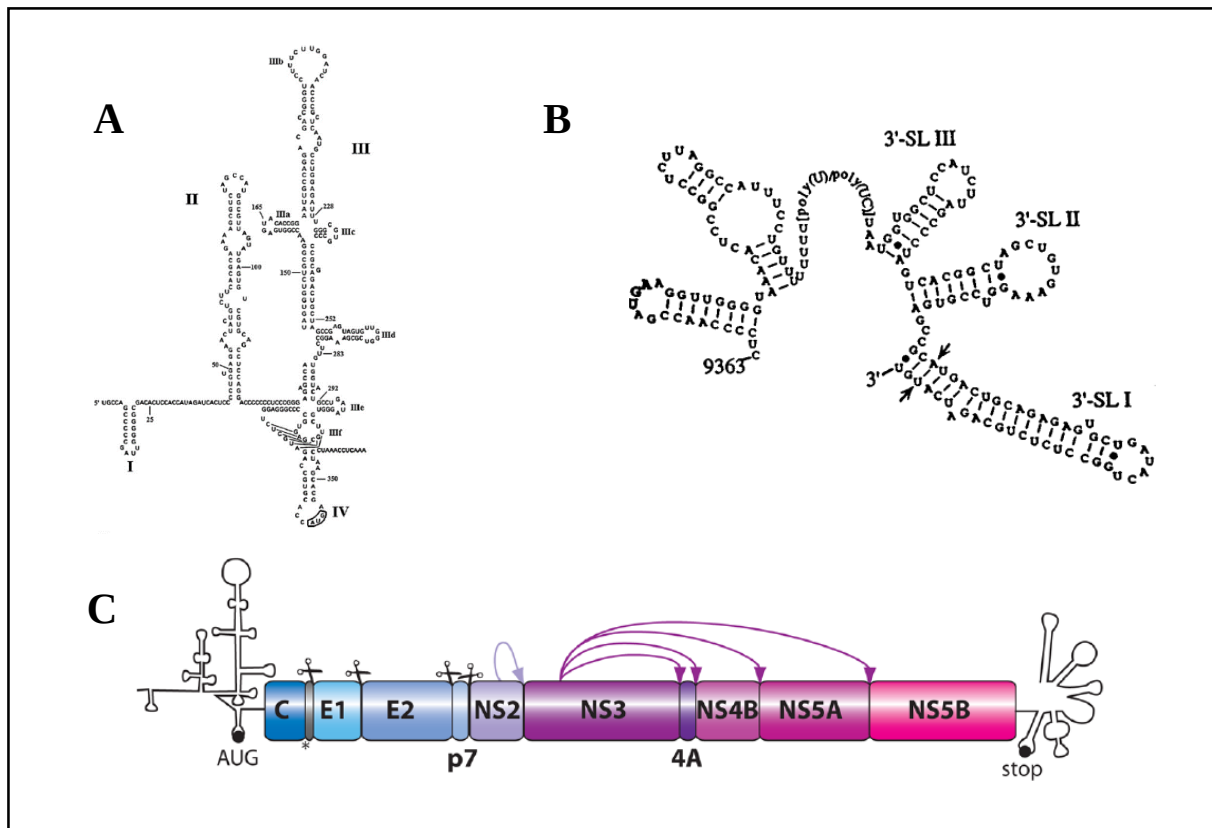


Figure 10. Organisation génomique et structure des régions 5' et 3' UTR
(D'après Kolykhalov *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2009; Lohmann & Bartenschlager, 2013)

3) Protéines virales

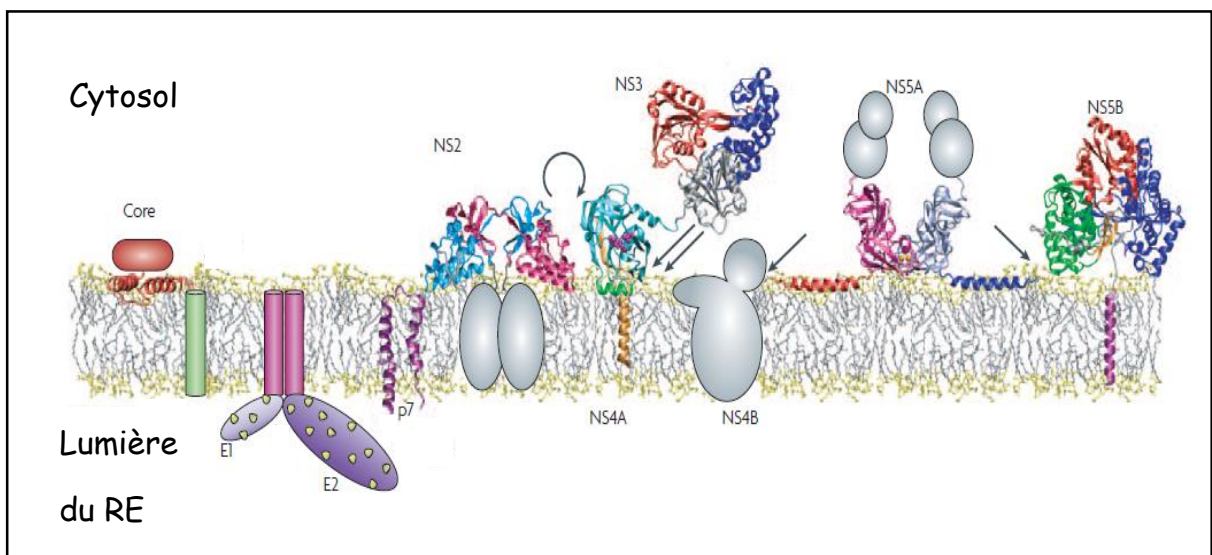


Figure 11. Structure des protéines du virus de l'hépatite C
(d'après Moradpour *et al.*, 2007)

a) Protéines structurales

La protéine de capsid

La première protéine issue de la polyprotéine précurseur est la protéine de capsid (« core »), dont le début de séquence codante est commun à la fin de celle de l'IRES. Il s'agit de l'une des protéines du VHC les plus conservées, les séquences présentant plus de 80% d'homologie intergénomiques (Bukh *et al.*, 1994). Cette conservation suggère un rôle prépondérant de la core au sein du cycle infectieux du virus, en particulier dans les mécanismes de l'assemblage des particules virales infectieuses.

La protéine de capsid est une protéine basique, de 23 kDa composée de 191 aa et organisée en trois domaines structurellement et fonctionnellement différents. Elle est essentiellement retrouvée sous forme de dimères stabilisés par les ponts disulfures créés par la Cystéine en position 128 (Kushima *et al.*, 2010).

Le premier domaine de la protéine de capsid (D1), situé en région Nterminale, est une région hydrophile constitué de 117 résidus principalement basiques. Il s'agit d'un domaine responsable de l'interaction avec les extrémités 5'NC et 3'NC (Région 3'X) de l'ARN viral (Yu *et al.*, 2009) et conférant à la protéine de capsid un rôle chaperon pour l'ARN viral (Ivanyi-Nagy *et al.*, 2006). Ce mécanisme permet en effet la dimérisation des brins d'ARN positifs dans le but suggéré de réguler la réplication et faciliter leur encapsidation (Cristofari, 2004).

D1 a également été décrit comme responsable de l'homodimérisation de la protéine de capsid permettant la formation de la nucléocapsid. Plusieurs travaux ont en effet démontré que seuls les 75 (Majeau, 2004) ou 82 (Fromentin *et al.*, 2007) premiers acides aminés de la protéine de capsid étaient suffisants pour former une nucléocapsid *in vitro*. Suite à différentes expériences utilisant des séquences de capsides mutées ou tronquées, cette homodimérisation a été présentée comme étant sous le contrôle des résidus basiques et plus particulièrement de la charge positive créée par leur présence (Fromentin *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2005). De façon plus précise, diverses expériences de mutagenèse ont identifié des résidus nécessaires à l'assemblage de particules virales (Kunkel & Watowich, 2004) (**Tableau I**) Cependant, l'ensemble de ces données ne sont pas très claires, plusieurs études ayant également suggéré que la région comprise entre les acides aminés 76 et 107 pourrait être impliquée dans l'homodimérisation de la protéine et intervenir dans une interaction avec la protéine d'enveloppe E1 (Boulant *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 1996). Outre ces fonctions essentielles pour les étapes de

morphogenèse du virus, le domaine a été largement décrit comme impliqué dans le développement de la pathogenèse en intervenant sur les voies apoptotiques, l'immortalisation des hépatocytes ou encore le développement de la stéatose (Pour revue, Khaliq *et al.*, 2011).

Le deuxième domaine (D2) est quant à lui prédit comme adoptant une structure en deux hélices α amphipathiques: l'hélice I (119-136 aa) et l'hélice II (148-164 aa) séparées par une boucle hydrophobe, ces trois éléments conférant la nature hydrophobe à cette région D2 (Boulant, 2006). Ce motif hélice-boucle-hélice est directement impliqué dans la localisation de la protéine de capsid au niveau des membranes du RE, mais aussi à la surface des gouttelettes lipidiques (Boulant *et al.*, 2005; Hourieux *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que l'introduction de mutations ou la réalisation de délétions dans D2 perturbaient fortement l'adressage de la protéine à la surface des gouttelettes lipidiques et de ce fait diminuaient voire inhibaient la production de particules infectieuses (Boulant, 2006; Boulant *et al.*, 2007; Hope *et al.*, 2002; Miyanari *et al.*, 2007) (**Tableau I**). D2 interviendrait également dans le repliement de D1 et la stabilité de la protéine (Boulant, 2006), en la protégeant vis à vis des mécanismes de dégradation cellulaire (Murray *et al.*, 2007).

Le dernier domaine (D3) est responsable de l'ancrage de la protéine de capsid à la membrane du RE. Il agit comme un Peptide Signal, notamment en adressant la polyprotéine en cours de synthèse aux membranes du RE et en permettant la translocation de la glycoprotéine E1 à la lumière du RE (Santolini *et al.*, 1994) (**Figure 12a**).

Suite à ces événements, la protéine de capsid va subir une série de clivages par des peptidases cellulaires. Une signal peptidase (SP) effectue le premier clivage à la jonction core-E1 pour donner naissance à la protéine de capsid immature de 23 kDa (**Figure 12a-b**). Un second clivage par l'intermédiaire du signal peptide peptidase (SPP) tronque la protéine de son troisième domaine (D3) (**Figure 12c**) à proximité du résidu 177 (Okamoto *et al.*, 2008) et permet l'adressage de la protéine de capsid mature obtenue (21 kDa) du RE aux gouttelettes lipidiques (McLauchlan *et al.*, 2002) (**Figure 12d**). Par ailleurs, il a été démontré que la maturation de la protéine core, successivement par la SP puis la SPP (Pène *et al.*, 2009), constitue un pré-requis pour l'assemblage de pseudo-virions du VHC en système pSFV (Ait-Goughoulte, 2006) et est nécessaire à la formation de particules virales infectieuses dans le système HCVcc (Targett-Adams *et al.*, 2008).

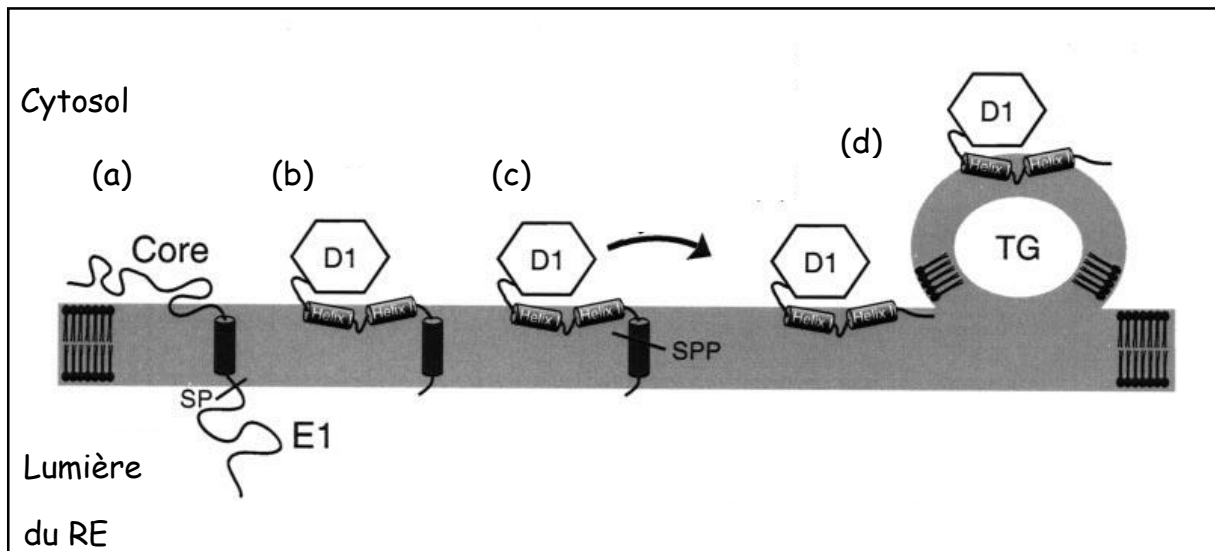


Figure 12. Maturation de la protéine Core (d'après Boulant, 2006)

Suite au clivage du domaine 3, la protéine de capsid mature (21 kDa) est libérée de la membrane du RE. Elle est majoritairement retrouvée à la surface des gouttelettes lipidiques (**Figure 13**), quelques soit la lignée cellulaire utilisée (Barba *et al.*, 1997; McLauchlan, 2000; Moradpour *et al.*, 1996; Rouille *et al.*, 2006) ainsi que dans les hépatocytes de patients infectés (Falcón *et al.*, 2005). Une localisation au niveau des membranes du RE a également été décrite, des localisations mitochondriales et nucléaires ont été proposées mais seraient la conséquence du modèle utilisé (Rouille *et al.*, 2006; Schwer *et al.*, 2004) ou contestée.

Les gouttelettes lipidiques (GL) sont des structures dérivées du RE. L'accumulation de triglycérides et d'esters de cholestérol entre les deux feuillets de la membrane du RE provoque une déformation de la membrane conduisant au bourgeonnement d'une gouttelette entourée d'une monocouche de phospholipides (Murphy & Vance, 1999; Robenek *et al.*, 2004). La formation de ces organites reste encore mal connue et on ne sait encore à l'heure actuelle si ces GL restent intimement associés au RE ou s'en détachent complètement pour s'individualiser. Ce sont des organites dynamiques, d'une taille initiale de 0,1µm grossissant par fusion jusqu'à atteindre 50µm selon le type cellulaire, mobiles et associées à certains organites cellulaires (RE, mitochondries) (Brasaemle & Wolins, 2012; Targett-Adams *et al.*, 2003). De nombreuses protéines cellulaires interagissent avec la monocouche phospholipidique des GL, les protéines PAT représentées par les périlipines, l'adipophiline (ADRP), et TIP47 (Fujimoto, 2004; Wolins, 2001) ou certaines protéines Rab, comme Rab18 (Ozeki, 2005). Il est probable que la protéine de capsid, initialement présente au niveau du feuillet externe de la membrane du RE au moment de leur traduction pourraient être embarquées par les gouttelettes lipidiques à partir

du RE, par un mécanisme différent de celui de l'ADRP (*Adipocyte differentiation-related protein*), qui semble traduite par les ribosomes libres dans le cytoplasme, puis est recrutées aux gouttelettes lipidiques à partir du cytosol. L'association de ces protéines cytosoliques aux gouttelettes lipidiques a par ailleurs été proposée comme étant réversible (Brown, 2001; Nakamura *et al.*, 2004). Outre leur rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, leur association à de multiples compartiments membranaires permettrait un échange dynamique de composants protéiques et lipidiques (Brasaemle & Wolins, 2012), sans que ce processus de transfert soit clairement établi.

Ce trafic vers les gouttelettes est lié uniquement à la forme mature de la protéine de capsid (p21), l'étude de mutants inhibant le clivage par la SPP ayant montré que la protéine restait localisée au sein des membranes du RE (Ait-Goughoulte, 2006; McLauchlan, 2002). Le domaine transmembranaire D3 ancre en effet la protéine, l'empêchant de diffuser vers d'autres organites.

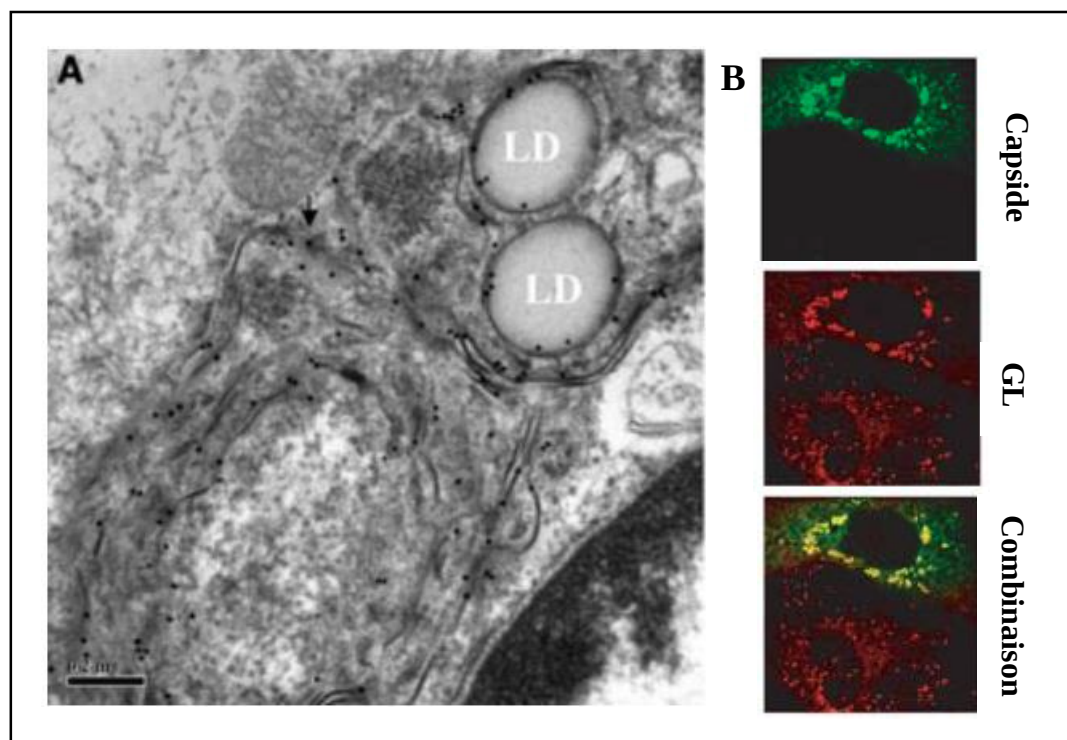


Figure 13. Interaction de la protéine de capsid du VHC avec les gouttelettes lipidiques
(d'après Hourieux *et al.*, 2007; Roingeard & Hourieux, 2007)

(A) Analyse en microscopie électronique à transmission de cellules BHK 21 exprimant la protéine de capsid à l'aide du système d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki. La localisation de la protéine est détectée par un immunomarquage spécifique en billes d'or (B) La protéine de capsid est exprimée à l'aide du système d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki et marquée à l'aide de l'anticorps monoclonal C7-50, les GL (ou LD : Lipid droplets) sont marquées à l'aide du Nile Red. L'analyse en microscopie confocale révèle la colocalisation entre ces deux éléments.

L'hydrophobicité de D2, associée à la formation de ses deux hélices α , permet également à la protéine de capsid mature (p21) de se lier aux membranes intracellulaires et est donc indispensable à la localisation de cette protéine au RE (Boulant, 2006; Hourieux *et al.*, 2007). Dans ce contexte, la protéine de capsid a été montrée comme initiateur du mécanisme de bourgeonnement de pseudo-particules au niveau de ces membranes du RE (Roingeard *et al.*, 2008), illustrant son rôle essentiel dans la morphogenèse virale.

De manière intéressante, la protéine de capsid mature de HC-J6 (Okamoto *et al.*, 1991), dans le contexte de la chimère Jc1, s'est révélée que n'être partiellement localisée aux gouttelettes lipidiques (Shavinskaya *et al.*, 2007). Ce phénomène, imputé à la présence de résidus critiques au sein du domaine D2 (Tableau I) est par ailleurs corrélé avec une production virale accrue. Plus récemment, il a été montré que la protéine de capsid de cette chimère Jc1 était majoritairement localisée au niveau des membranes du RE (Boson *et al.*, 2011), probablement par une ou plusieurs associations avec les protéines p7 et NS2. Alors qu'en parallèle, un adressage massif de la protéine de capsid JFH-1 aux gouttelettes lipidiques s'avère indispensable à la production virale (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007), l'observation des propriétés de la protéine de capsid HC-J6 suggère que les mécanismes d'assemblages pourraient différer en fonction de la séquence de protéine de capsid, voire de la séquence des protéines p7 et NS2.

Tableau I : Résidus de la protéine de capsid montrés comme impliqués dans la formation de particules virales			
Région de la Core	Résidus	Implication	Sources
Domaine I	W76 - W83 - W93 W96 - W107	Multimérisation de la protéine de capsid	(Kunkel & Watowich, 2004)
Domaine II	L126 - F130 - L133 - M134 - V140 - L144 - A147 - L151	Adressage de la protéine de capsid aux GL	(Boulant, 2006)
Domaine II	I123 - L126 - F130 - L133 - M134 - L139 - V140 - L144 - A147 - A150 - L151 - L158	Stabilisation de la protéine de capsid	(Boulant, 2006)

Domaine II	P138 - P143	Stabilisation de la protéine de capsid	(Hope <i>et al</i> , 2002)
Domaine II	S99	Production particules infectieuses	(Murray <i>et al</i> , 2007)
Domaine II	C172	Adressage de la protéine de capsid aux membranes	(Majeau <i>et al</i> , 2009)
Domaine II	C128	Stabilisation des dimères de protéine de capsid	(Kushima <i>et al</i> , 2010)
Domaine II	V147	Production de particules infectieuses	(Shavinskaya <i>et al</i> , 2007)

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 possèdent des caractéristiques et des mécanismes d'action difficilement dissociables tout au long du cycle infectieux. Elles sont chacune constituées d'un ectodomaine formé par la partie N-terminale et d'une région C-terminale hydrophobe structurée en hélice α et impliquée dans l'ancrage membranaire dans le RE et à leur hétérodimérisation sous forme d'hétérodimères non-covalents (Helle & Dubuisson, 2008). Par la suite, ces protéines sont retrouvées à la surface des particules infectieuses sous forme d'hétérodimères stabilisés par des ponts disulfures (Vieyres *et al.*, 2010).

Au cours de leur traduction, les ectodomains de E1 et E2 sont transloqués vers la lumière du RE grâce aux peptides signaux localisés dans l'extrémité C terminale de la protéine de capsid immature (p23). Suite aux clivages E1/E2 et E2/p7 réalisées par les peptidases cellulaires, les domaines transmembranaires des deux glycoprotéines, comprenant deux segments hydrophobes, s'orientent vers le cytosol et s'ancrent dans la membrane du RE (Cocquerel *et al.*, 2002) (**Figure 14**).

Dans la lumière du RE, différentes modifications post-traductionnelles vont permettre leur glycosylation, E1 et E2 comportant respectivement 4/5 et 11 sites de N-glycosylation. Les différents rôles de ces glycosylations ont largement été décrits dans la littérature démontrant

ainsi l'impact essentiel de ces sucres dans le cycle infectieux du virus. Des expériences de mutagenèse dirigées ont démontré leurs implications dans l'acquisition de la conformation du dimère E1/E2, un mécanisme essentiel pour l'incorporation des protéines d'enveloppe dans les particules infectieuses (Falkowska *et al.*, 2007; Goffard *et al.*, 2005). La glycosylation est également importante pour l'entrée virale, puisque la délétion ou mutation de certains sites réduit l'infectiosité du virus (Goffard *et al.*, 2005). Enfin, plus récemment, il a été montré que certains glycanes formaient un « bouclier », perturbant l'accès et la reconnaissance des anticorps neutralisants anti E2, ce bouclier ayant un rôle de régulation de l'entrée virale en recouvrant le site de liaison à CD81, selon un mécanisme permettant ainsi l'échappement au système immunitaire (Helle *et al.*, 2007, 2010)

La partie N-terminale d'E2 possède trois régions hypervariables (HVR) dont HVR1 qui malgré sa grande variabilité entre génotypes possède des caractéristiques physico-chimiques et une conformation conservées (Penin *et al.*, 2001) Ceci suggère que cette région possède un rôle important, plusieurs études ont démontré son implication dans l'entrée virale par l'intermédiaire de ses résidus basiques favorisant l'infection (Callens *et al.*, 2005) et par son interaction avec le récepteur SR-B1 (Scarselli *et al.*, 2002). Cependant de façon corolaire à cette variabilité, la séquence d'HVR1 contribue de fait à l'échappement du virus à la réponse immunitaire (von Hahn *et al.*, 2007).

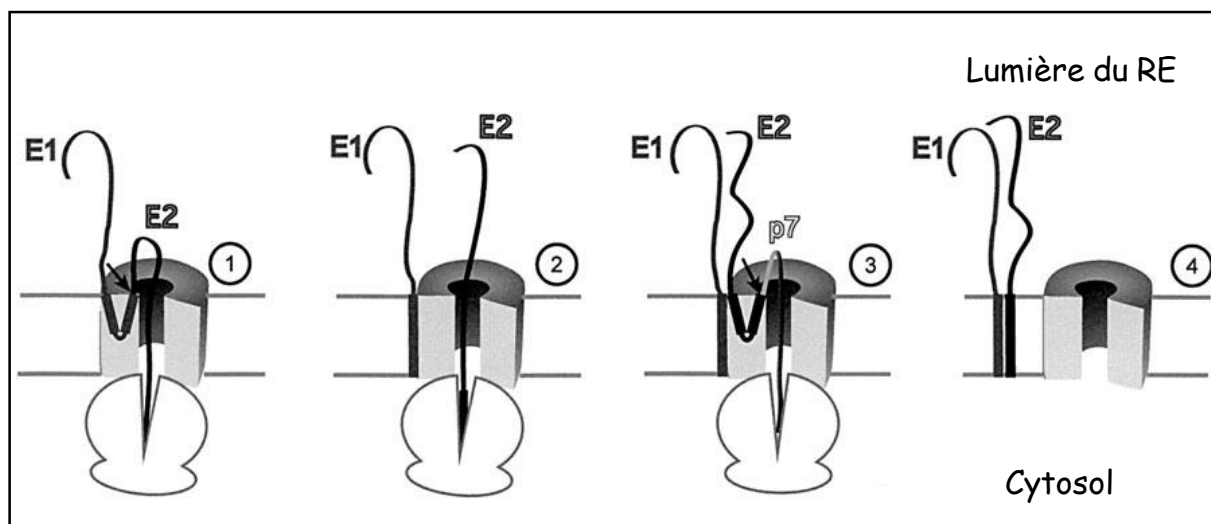


Figure 14. Conformation des glycoprotéines acquise après traduction

(d'après Cocquerel *et al.*, 2002)

(1) L'extrémité N-terminale de E1 est orientée vers la lumière du RE ainsi que la partie N-terminale de son domaine transmembranaire. La partie C-terminale du domaine transmembranaire de E1 oriente E2 vers la lumière du RE. (2) Suite au clivage entre E1 et E2, la partie C-terminale de E1 est dirigée vers le cytosol. (3) Le domaine transmembranaire de E2 permet la translocation de p7 (4) Après clivage entre E2 et p7, le domaine transmembranaire de E2 est réorienté vers le cytosol. Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont ancrés dans la membrane du RE.

b) Protéines non-structurales

La protéine p7

P7 est une petite protéine membranaire de 63 aa dont les deux extrémités 5' et 3' orientées vers la lumière du réticulum endoplasmique. L'analyse en résonance magnétique nucléaire (RMN) révèle la présence d'une extrémité N-terminal et deux domaines transmembranaires structurés sous forme d'hélice alpha (Montserret *et al.*, 2010). Différentes études, réalisées à l'aide de la microscopie électronique et de la RMN, ont permis la mise en évidence de l'assemblage des formes monomériques de p7 en hexamère ou heptamère permettant la formation d'un canal ionique au sein de la membrane du RE (Clarke *et al.*, 2006; OuYang *et al.*, 2013). Si cette protéine a été démontrée comme indispensable à l'infectiosité du virus *in vivo* il y a plus de 10 ans (Sakai *et al.*, 2003), plus récemment son rôle essentiel dans le cycle viral a aussi été démontré *in vitro* à l'aide du modèle HCVcc (Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). Cette viroporine p7 agirait en régulant le pH dans les compartiments où sont retrouvés les particules virales dont la formation est sensible au pH acide (Wozniak *et al.*, 2010). Plus récemment, l'implication de p7 dans la morphogénèse a été démontrée de par son association avec NS2 pour le recrutement de diverses protéines virales lors de l'assemblage (Boson *et al.*, 2011; Popescu *et al.*, 2011) et par sa capacité à interagir avec la protéine de capside pour permettre l'assemblage et la sécrétion des particules virales (Gentzsch *et al.*, 2013).

La protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire constituée de 217 acides aminés (21-23 kDa). Si le clivage p7/NS2 est effectué par une signal peptidase cellulaire, le clivage de la jonction NS2/NS3 est réalisé par l'extrémité C-terminale cytosolique de NS2 présentant une activité de protéase à cystéine dépendante du zinc, fonctionnelle après association avec l'extrémité N-terminale de NS3 (Grakoui *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 2006; Schregel *et al.*, 2009). NS2 possède également une extrémité N-terminale hautement hydrophobe dont l'analyse par RMN a révélé la présence de trois domaines transmembranaires (TMS1, 4-23 ; TMS2, 27-49 ; TMS3, 72-94) structurés en hélice α (Jirasko *et al.*, 2010), permettant ainsi son insertion au sein de la membrane du RE.

NS2 est également la seule protéine non structurale à ne pas participer à la formation du complexe de réplication de l'ARN (Lohmann, 1999). En revanche, Pietschmann *et al* ont démontré que la chimère Jc1 constituée d'une protéine NS2 composite, composée en N-terminal de séquences issues de la souche HC-J6 et en C-terminal de la séquence de JFH-1 était capable d'une plus grande production de particules infectieuses comparativement à la chimère FL-J6/JFH-1 comportant la séquence complète de NS2 de HC-J6, suggérant que NS2 était impliquée dans les phases de l'assemblage en relation avec la réplication de l'ARN viral (Pietschmann *et al.*, 2006). Cette hypothèse a depuis été renforcée par diverses études ayant mis en évidence l'apparition de mutations adaptatives dans la séquence de NS2 ayant pour effet l'augmentation de la production virale (Russell *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2007). Plus récemment, plusieurs travaux ont montré le rôle de NS2 dans l'assemblage par interactions avec la protéine de capsid, E2, p7, NS3 et NS5A à proximité des gouttelettes lipidiques (Boson *et al.*, 2011; Jirasko *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Popescu *et al.*, 2011). Ceci suggère globalement que NS2 pourrait constituer une plateforme, en concentrant les différentes protéines virales structurales et non structurales requises pour l'assemblage et la sécrétion du virion infectieux.

Le complexe NS3-4A

NS3 est une protéine à multiples fonctions, longue de 631 aa, possédant un domaine protéase à sérine (NS3pro) en position N-terminale (1-180aa) et un domaine hélicase/NTPase (NS3hel) situé dans les deux derniers tiers C-terminal (181-631 aa) et démontré comme indispensable à la traduction et réplication du génome viral (Borowski *et al.*, 2002).

NS3pro participe au clivage NS2/NS3 par la protéase NS2 comme expliqué précédemment, indépendamment de son activité protéase à sérine (Schregel *et al.*, 2009). En parallèle, la protéine transmembranaire NS4A interagit avec NS3 formant ainsi un complexe NS3-4A lié à la membrane du RE, stabilisant NS3 et activant son activité protéase (Pour revue Morikawa *et al.*, 2011). Associé à son co-facteur, NS3pro effectue le clivage, de façon séquentielle, à la jonction NS5A/5B amenant ainsi à la création d'un intermédiaire NS4A-NS5A. Par la suite, la protéase à sérine est impliquée dans la genèse des protéines allant de NS4A de NS5B donnant naissance au dernier produit transitoire : NS4B-5A dont le dernier clivage permettra l'obtention de NS4B et NS5A (Pietschmann *et al.*, 2001) (**Figure 10C**). Outre cette fonction, NS3pro

permet au complexe NS3-4A d'assurer le clivage de deux protéines cellulaires : MAVS et TRIF, protéines des voies de signalisation antivirales RIG-1 et TLR3 (Li *et al.*, 2005a, b). La perturbation de ces voies de signalisation montre que NS3 est impliquée dans l'échappement à la réponse du système immunitaire par interféron de type I, et participe ainsi à la persistance du virus chez l'hôte.

En plus de ses rôles dans le clivage de la polyprotéine et la réplication/traduction de l'ARN viral, NS3-4A semble également intervenir dans les étapes de morphogénèse : NS3hel s'associerait aux protéines de capsid et NS5A à proximité des gouttelettes lipidiques lors des étapes précoces permettant ainsi l'assemblage des particules infectieuses (Ma *et al.*, 2008). NS4A a été par ailleurs suggéré comme participant à l'état d'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Lindenbach *et al.*, 2007).

La protéine NS4B

Dernière des protéines libérées lors du clivage de la polyprotéine, NS4B une protéine membranaire de 27 kDa, hydrophobe et entièrement ancrée dans la membrane du RE (Hügler *et al.*, 2001).

Structurellement, elle est constituée d'un domaine N-terminal comprenant deux hélices α amphipathiques (AH1 et AH2) présentant leur côté hydrophobe au versant cytosolique de la membrane du RE. Cette région a été suggérée comme impliquée dans les mécanismes de réplication de l'ARN viral (Elazar *et al.*, 2004), dont AH2 serait le principal acteur. La seconde hélice possède en effet la capacité de s'oligomériser puis de s'intégrer dans la membrane du RE (Gouttenoire *et al.*, 2009) permettant ainsi l'oligomérisation de la protéine NS4B, un mécanisme nécessaire à la formation du complexe de réplication (Gouttenoire *et al.*, 2010). L'extrémité C-terminale possède également deux hélices α H1 et H2 (Jones *et al.*, 2009; Welsch *et al.*, 2007) dont l'action dans l'oligomérisation de NS4B et dans la formation du complexe de réplication a également été démontrée (Paul *et al.*, 2011).

Ces différents mécanismes d'oligomérisation permettent à la protéine NS4B d'induire les réarrangements spécifiques de membranes dérivés du RE conduisant à la formation du « Membranous Web », constituant la plateforme de réplication de l'ARN viral (Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003).

La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine capable de présenter une forme phosphorylée (56kDa) et hyperphosphorylée (58kDa) (Kaneko *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1995). Elle possède une région N-terminale contenant une hélice α amphipathique essentielle à son ancrage à proximité des membranes du RE et du complexe de réplication (Brass, 2002) ainsi que trois domaines distincts. Le premier domaine DI, localisé en région N-terminale, s'articule en un motif « doigt de zinc » essentiel au mécanisme de réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2004) et à l'adressage de NS5A à la surface des gouttelettes lipidiques (Miyanari *et al.*, 2007). Par ailleurs, des analyses en cristallographie ont montré que l'homodimérisation de DI permettait une interaction avec l'ARN viral (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Le domaine DII interagit avec la protéine cellulaire FBL2, une association indispensable à la réplication virale (Wang *et al.*, 2005) et serait responsable de l'inhibition de la réponse antivirale interféron α (Tan & Katze, 2001). Enfin, le domaine DIII contient de nombreux sites phospho-accepteurs impliqués dans la phosphorylation de NS5A et interviendrait également dans l'assemblage et la production de particules infectieuses (Kim *et al.*, 2011).

Globalement, l'état phosphorylé ou hyperphosphorylé de NS5A semble être important pour la réplication de l'ARN et l'assemblage de particules virales. La protéine phosphorylée a en effet la capacité d'interagir avec diverses protéines cellulaires telles hVAP-A (human Vesicle-Associated membrane Protein-associated protein A) impliquée dans le transfert des protéines non-structurales vers les radeaux lipidiques des domaines membranaires nécessaires à la réplication virale (Evans *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004). Parallèlement à ces études, des expériences de mutations de résidus phospho-accepteurs dans DIII ont suggéré l'impact déterminant de l'hyperphosphorylation de NS5A pour la production de particules virales (Tellinghuisen *et al.*, 2008). A partir d'approches semblables, DIII a été identifié comme nécessaire à l'interaction de NS5A avec la protéine de capsid et à leur localisation à proximité des gouttelettes lipidiques, nécessaire pour la production de particules virales (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007).

La protéine NS5B

NS5B est la polymérase ARN dépendante (RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase*) du virus de l'hépatite C. Très conservée à travers les différents génotypes, elle permet la création du brin

ARN négatif matrice qu'elle utilise comme modèle complémentaire pour produire les nouveaux brins d'ARN positif (Behrens *et al.*, 1996). Peu fidèle, elle est responsable de l'incorporation de nombreuses mutations dans l'ARN viral, expliquant l'apparition de nombreux variants et génotypes à travers l'évolution du virus (Stumpf & Pybus, 2002).

Cette protéine de 68 kDa est constituée d'un domaine catalytique N-terminal organisé en une structure correspondant à une main droite ouverte où des sous-domaines N et C-terminaux, représentant respectivement les doigts et le pouce, encadrent un sous-domaine central (ou paume) créant une forme de tunnel qui guide la molécule d'ARN au site actif porté par cette paume (Bressanelli *et al.*, 1999, 2002; Lesburg *et al.*, 1999). Un second tunnel, chargé positivement, permet l'entrée des NTPs et leur passage vers le site actif. Le domaine C-terminal de la protéine permet un ancrage dans la membrane du RE essentiel pour la réplication virale (Moradpour *et al.*, 2004).

C. Modèles d'études du cycle infectieux du virus de l'hépatite C

Des années après la découverte et la caractérisation du génome du virus de l'hépatite C (Choo *et al.*, 1989), aucun modèle de culture *in vitro* du virus ne s'est avéré complètement satisfaisant pour l'étude du cycle infectieux. Dès le début des années 1990, des tentatives de culture furent effectuées sur différentes lignées cellulaires infectées par du sérum de patients mais aucune réplication de l'ARN ne fut clairement démontrée (Shimizu *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1996; Seipp *et al.*, 1997). En effet, si de l'ARN pouvait être détecté en très faible quantité lors de ces expériences, ni les techniques de Western Blot ou d'Immunofluorescence ne permettaient la détection de protéines virales, en vue d'affirmer une réplication virale significative dans ces modèles *in vitro*.

En parallèle de ces essais utilisant des inoculats sous forme de sérum infectieux, le clonage du génome permis l'obtention de son ADNc pouvant être transcrit *in vitro* à l'aide d'un promoteur T7 préalablement inséré en amont de la séquence. Les nombreux ARNs viraux ainsi obtenus furent transfectés dans différentes lignées cellulaires, s'affranchissant ainsi des étapes d'entrée virale. Bien que cette stratégie ait été validée pour de nombreux virus à ARN positif (Boyer & Haenni, 1994), cette méthode fut un échec dans le cas du virus de l'hépatite C.

Avec le recul, le résultat négatif de cette dernière tentative s'explique par l'absence de la région X de la région 3'NC de la séquence publiée par Choo, (Choo *et al.*, 1989), région qui fut découverte des années plus tard (Tanaka *et al.*, 1995; Kolykhalov *et al.*, 1996).

Fort de ces constats, plusieurs équipes parvinrent à développer des séquences de génomes entiers. Des expériences *in vivo* ont permis d'identifier certaines de ces souches du VHC comme capables d'induire une infection et de se répliquer efficacement (Kolykhalov *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 1997). Cependant, ces génomes utilisés *in vitro* ont montré qu'ils étaient incapables d'initier une répllication sur culture cellulaire (Blight *et al.*, 2000, 2003).

1) Le réplicon sous-génomique

L'absence de modèle capable de modéliser un cycle viral complet pour le VHC amena au développement des réplicons sous-génomiques, des systèmes déjà utilisés pour plusieurs virus à ARN simple brin positif. Dans le cadre de divers *flaviviridae*, l'utilisation d'un tel outil a démontré l'implication des seules protéines non structurales dans la répllication virale (Kaplan & Racaniello, 1988; Khromykh & Westaway, 1997; Mittelholzer *et al.*, 1997; Behrens *et al.*, 1998). Dans cet esprit, le Dr Lohmann mit au point une séquence de la souche de VHC Con1 (génotype 1b) dont les séquences codantes les protéines structurales avaient été remplacées par un gène de résistance à la drogue G418 (généticine) suivi d'un IRES dérivé de celui de l'ECMV (Lohmann, 1999) (**Figure 15**). Ainsi, l'IRES HCV permettait la traduction du gène de résistance à G418 tandis que l'IRES ECMV était utilisé pour la production des protéines non structurales du virus. Ce système utilisé en lignée cellulaire Huh 7 permit la sélection de cellules résistantes, indiquant une répllication significative de la construction, par la suite confirmée par détection de l'ARN viral en Northern Blot. Des techniques de Western Blot et immunofluorescence révélèrent également la présence des protéines virales dans ces cellules. Ces premiers modèles de réplicons sous-génomiques se révélèrent être des outils fonctionnels constituant ainsi les premiers modèles fiables pour l'étude de la répllication du VHC et des protéines non structurales.

L'utilisation de réplicons sous-génomiques a également permis d'illustrer l'impact du contexte cellulaire dans la répllication de l'ARN viral. Plusieurs sous populations cellulaires de la lignée Huh 7 et traitées à l'interféron α pour éliminer l'ARN sous-génomique, ont montré que ces clones après une seconde transfection permettaient une répllication plus efficace de ces réplicons sous-génomiques, comparativement à la lignée parentale Huh 7. Cette approche a permis ainsi

d'obtenir le clone cellulaire Huh 7.5 présentant des caractéristiques cellulaires favorables à la réplication virale (Blight *et al.*, 2002).

Grace à ce système, des candidats antiviraux interférant dans la réplication du VHC, comme les inhibiteurs de la protéase NS3/4A et la polymérase NS5B ont pu être testés (Bartenschlager, 2002; De Francesco & Migliaccio, 2005; Pawlotsky *et al.*, 2007).

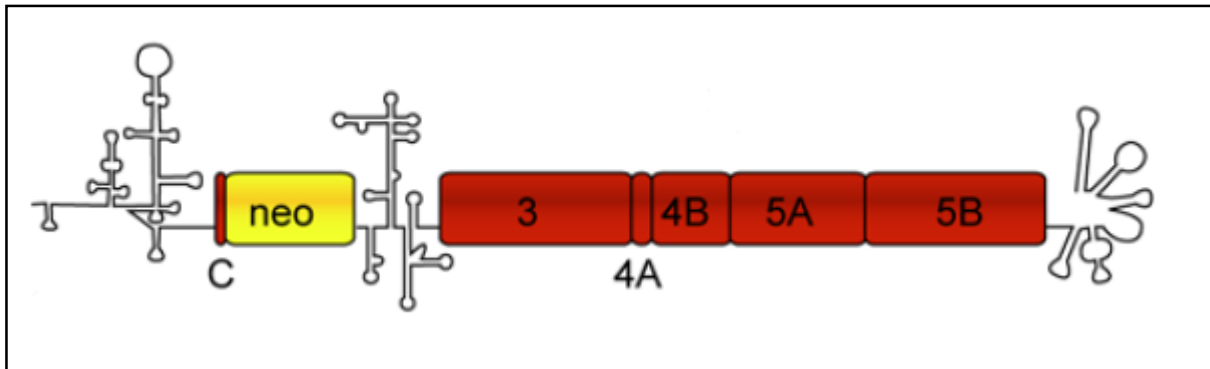


Figure 15. Modèle d'un réplicon sous-génomique

(d'après Lohmann & Bartenschlager, 2013)

Les réplicons contiennent la région 5' du VHC et les premières bases de la séquence de la protéine de capsid communes à l'IRES (« C » en rouge), le gène de sélection néomycine phosphotransférase (« neo ») qui confère la résistance à la G418 (ou généticine), un site d'entrée interne des ribosomes de l'ECMV contrôlant la traduction des protéines NS3 à NS5B, et la région 3' du VHC.

2) Le système dérivé du virus de la forêt de Semliki

L'outil d'étude des protéines non structurales qu'est le réplicon sous-génomique n'a pas permis l'analyse des étapes d'assemblages des particules virales, contrôlés par les protéines structurales capsid, E1 et E2. De plus, l'absence de visualisation de virions sur tissus infectés ou en cellules exprimant les protéines structurales *in vitro*, entraîna le développement de modèles alternatifs. L'équipe de Blanchard *et al.* s'est dirigé vers l'utilisation de vecteurs d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV) (Schlesinger & Dubensky Jr, 1999) pour exprimer les protéines structurales du VHC, ces vecteurs ayant l'avantage de posséder un promoteur efficace pour la traduction des séquences d'intérêt insérées tout en étant capables d'initier un haut niveau d'autoréplication de par l'expression de ses protéines non structurales (**Figure 16a**). La transfection de cellules mammifères BHK-21 à l'aide de vecteur SFV codant les 3 protéines structurales du virus de l'hépatite C ont ainsi permis la visualisation en microscopie électronique de pseudo bourgeonnement au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (Blanchard *et al.*, 2002) (**Figure 16b**), un phénomène qui pouvant par la suite

être obtenu en n'exprimant que la protéine de capside (Blanchard *et al.*, 2003) (**Figure 16c**). Bien que ne fonctionnant pas en cellules hépatocytaires, ces vecteurs se sont révélés être des outils intéressants pour identifier l'impact de certains résidus ou certaines régions de la protéine de capside impliquées dans l'assemblage (Blanchard *et al.*, 2003; Hourieux *et al.*, 2007).

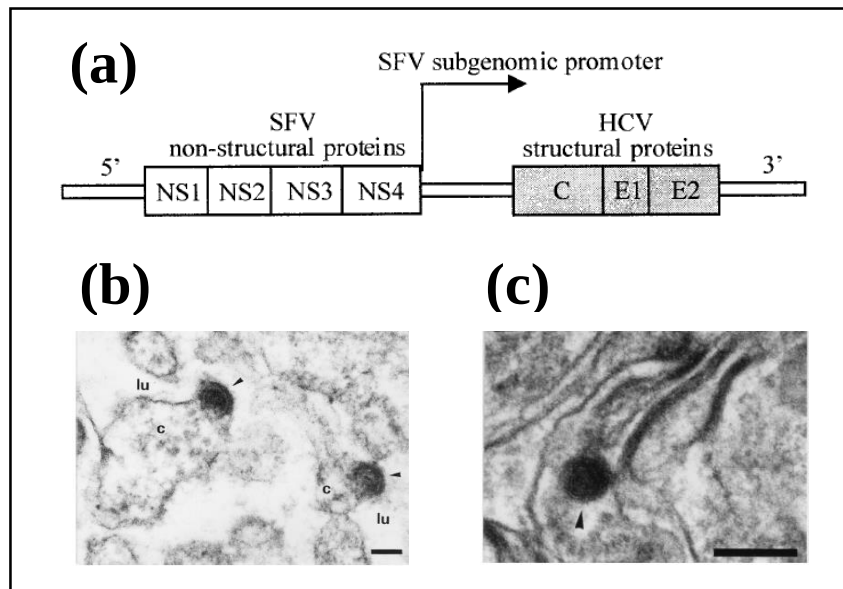


Figure 16. Expression des protéines structurales du VHC à l'aide du vecteur SFV
(d'après Blanchard *et al.*, 2002, 2003)
Barres d'échelle 50 nm (b) 100 nm (c)

3) Utilisation de Pseudo-Particules virales (VHC_{pp})

Les premiers modèles pour étudier les événements liés à l'entrée virale du VHC étaient fondés sur l'utilisation de glycoprotéines E2 tronquées (Flint *et al.*, 1999) qui ont permis d'identifier la molécule CD81 comme récepteur du VHC (Pileri, 1998). Par ailleurs, le développement d'approches plus complexes a permis la production de pseudo particules du VHC dans des cellules d'insecte à partir de baculovirus recombinants exprimant les protéines structurales Core, E1 et E2 du VHC (Baumert *et al.*, 1998).

En 2003, le développement de pseudo-particules (pp) infectieuses, constituées par des particules virales dérivées de lenti- ou rétrovirus incorporant les glycoprotéines E1 et E2 du VHC à leur surface (VHC_{pp}) a été une avancée déterminante pour les études de l'entrée du VHC. Incorporant également un gène rapporteur au sein de leur ARN viral, ces VHC_{pp} constituaient par ailleurs un modèle intéressant pour détecter leur capacité d'infection sur culture cellulaire (Bartosch *et al.*, 2003a; Hsu *et al.*, 2003). Pour produire ces pp, trois ADNs

plasmidiques sont co-transfectés dans les cellules HEK293T (cellules embryonnaires de rein humain). Ils conduisent à l'expression des glycoprotéines E1 et E2 du VHC (1^{er} plasmide), des protéines Gag et Pol du virus de la leucémie murine (MLV) ou du VIH (2^{ème} plasmide) et à la synthèse d'un génome proviral défectif codant la GFP ou la luciférase (3^{ème} plasmide).

Outre l'identification de facteurs d'attachement et de co-facteurs impliqués dans l'entrée du VHC dans les hépatocytes, ce modèle a constitué le premier modèle *in vitro* pour l'identification d'anticorps neutralisants dirigés contre le VHC. Il a en effet été démontré que les anticorps neutralisants issus de sérums de patients infectés par le VHC pouvaient bloquer ou réduire l'infectiosité des VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003b; Yu *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation de glycoprotéines de différents génotypes au sein de ce système a rendu possible l'étude de réactivité croisée d'anticorps neutralisants issus de sérums de patients infectés (Meunier *et al.*, 2005). Cette technique présente également un intérêt dans l'élaboration de stratégies vaccinales puisqu'elle permet d'étudier dans des conditions standardisables l'impact d'anticorps neutralisants produits post-vaccination sur les VHCpp et leur capacité à infecter des hépatocytes.

4) Le système VHCcc

L'année 2005 aura été un tournant majeur dans la recherche sur le VHC avec la mise au point d'un système de culture *in vitro* du virus complet (Wakita *et al.*, 2005). Initialement, une souche de génotype 2a issu d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (souche JFH-1 pour « *Japanese Fulminant Hepatitis 1* ») fut l'objet d'une publication de Kato et ses collègues en 2001. La séquence de cette souche présentait des variations majeures au niveau de la région 5' et des protéines NS3 et NS5A en comparaison des autres séquences de génotype 2a (Kato *et al.*, 2001). Cette souche, initialement adaptée en réplicon sous-génomique montra qu'elle était capable de se répliquer sans nécessiter de mutations adaptatrices. De plus, les titres en ARN du réplicon atteignaient des valeurs jusqu'à 20 fois supérieures à celles du réplicon historique Con1 adapté (Kato *et al.*, 2003).

Devant les capacités de répllication exceptionnelles de ce réplicon, le clone JFH-1 a ensuite été entièrement reconstruit pour donner naissance à la première souche de VHC cultivable *in vitro* (VHCcc) (**Figure17A**) (Wakita *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, cette souche JFH-1 est la seule

qui permette d'étudier toutes les étapes du cycle viral, depuis l'infection jusqu'à la production et la sécrétion de particules virales infectieuses. Les virions produits sont en effet capables d'infecter des cellules Huh 7.5 naïves et conduisent à une virémie chez le chimpanzé (Kato *et al.*, 2008). Les particules produites possèdent un diamètre moyen de 55 nm établi par microscopie électronique à transmission et présentent une densité hétérogène, mais relativement faible, signe d'une association variable avec les composants cellulaires type lipoprotéines (Cf. Page 35).

Les régions du génome conférant cette caractéristique de multiplication unique à la souche JFH-1 regrouperaient les séquences codant le domaine hélicase de la protéine NS3, la protéine NS5B et la région 3' (Murayama *et al.*, 2007). Bien que cela ne soit pas entièrement défini, des travaux comparant les activités enzymatiques de NS5B de JFH-1 et NS5B de HC-J6 (souche non répliquative *in vitro*) ont montré que l'ARN polymérase ARN-dépendante du clone JFH-1 présentait une activité 20 fois supérieure à celle de HC-J6 (Simister *et al.*, 2009)

5) Construction chimérique

Afin d'étudier les mécanismes d'entrée et le cycle infectieux de virus de l'hépatite d'un génotype autre que 2a ou dans le but d'augmenter la production virale, différentes chimères ont été synthétisées à partir du génome JFH-1.

La chimère intra-génotypique la plus notable est très certainement la chimère Jc1. Dès 2005, une construction constituée des séquences des protéines de capsid à NS2 du génome J6 (2a) et des protéines NS3 à NS5B de JFH-1 nommée FL-J6/JFH-1 (**Figure 17B**) s'avéra être capable de produire des particules infectieuses (Lindenbach, 2005) et dans des proportions 10 à 100 fois plus élevées que JFH-1. L'évolution marquante de cette stratégie fut la création d'une chimère semblable à FL-J6/JFH-1 mais dont la zone de fusion entre les séquences des deux génomes fut placée à la suite du premier domaine transmembranaire de NS2 (Jonction C3 – **Figure 17C**). En effet, cette chimère nommée Jc1 présenta des titres infectieux 100 à 1000 fois supérieurs à ceux du génome JFH-1 (Pietschmann *et al.*, 2006). Une amélioration des capacités d'assemblages liée spécifiquement à la nature de la capsid J6 dont l'assemblage avec les gouttelettes lipidiques se montre moins efficace dans une telle construction (Shavinskaya *et al.*, 2007). De nombreux travaux menés par l'équipe de Jens Bukh ont été réalisés à l'aide de chimères inter-génotypiques et ont notamment permis d'identifier les déterminants impliqués dans l'efficacité de la production virale et d'évaluer la réponse de thérapeutiques envers les différents génotypes. Ainsi, des chimères basées sur le modèle J6/JFH-1 possédant une

séquence NS5A d'un génotype donné ont ainsi permis d'évaluer l'efficacité des inhibiteurs de protéases dirigés contre les protéines NS5A de 7 génotypes différents (Scheel *et al.*, 2011), une étude similaire ayant été réalisé pour NS4A (Gottwein *et al.*, 2013a). Avec une philosophie semblable, des chimères basées sur le génome JFH-1 avec des séquences codant les protéines de core à NS2 de 7 génotypes différents ont été utilisés pour le test d'inhibiteurs de p7 (Gottwein *et al.*, 2011). Des chimères composées d'un squelette génotype 1a ou 3a dont les séquences NS3hel et NS5B ont été remplacées par celle du JFH-1 se sont avérées viables pour une propagation *in vitro* et ont ainsi été testée pour la réponse aux inhibiteurs de NS3 et NS5A (Gottwein *et al.*, 2013b). De façon intéressante, bien que ces constructions se répliquent efficacement, la production de particules virales requiert des mutations compensatrices acquises au cours des passages successifs des cellules transfectées.

Des chimères inter-génotypiques ont également été conçues dans le but d'étudier les capacités de neutralisation croisée des anticorps anti-VHC envers différents génotypes du VHC (Scheel *et al.*, 2008).

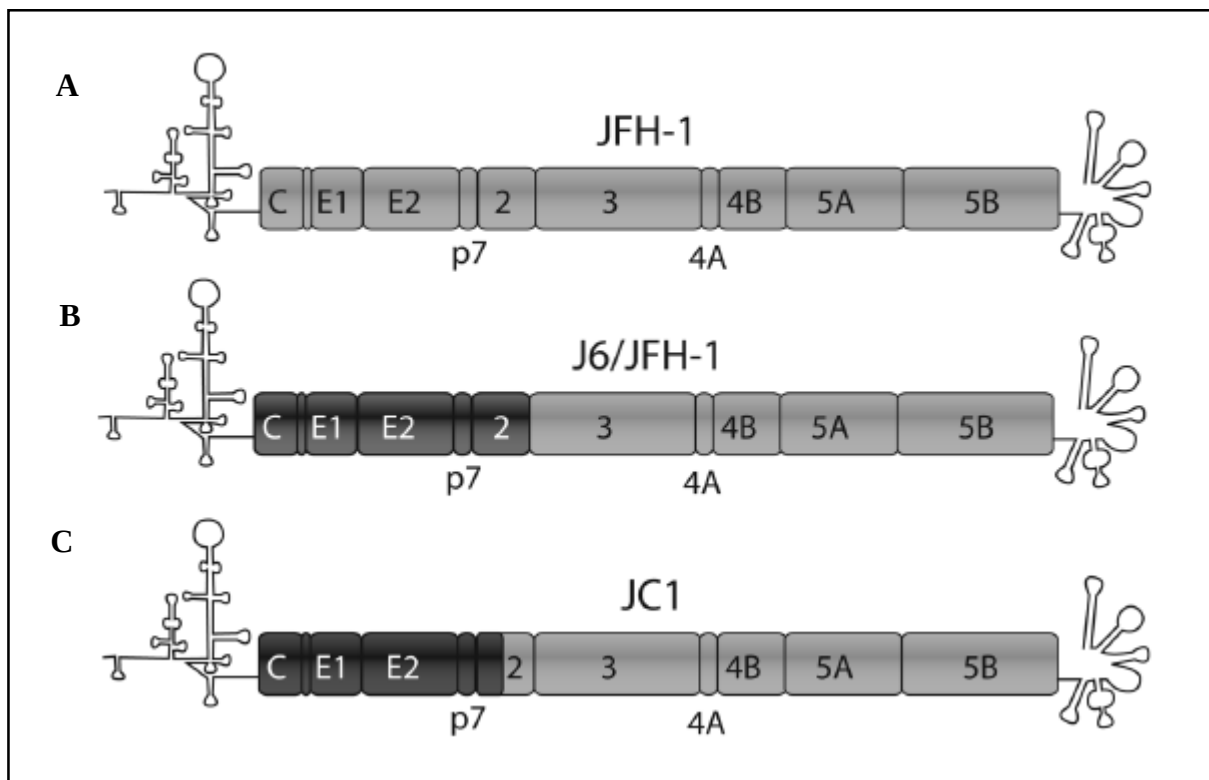


Figure 17. Systèmes de culture cellulaire du VHC
(Adapté d'après Lohmann & Bartenschlager, 2013)

6) Modèle d'infection de cultures primaires d'hépatocytes humains

Les cultures primaires d'hépatocytes humains constituent le modèle d'étude du VHC *in vitro* le plus physiologique. En effet, contrairement à la lignée d'hépatoblastome Huh 7.5, les hépatocytes issus de cultures primaires sont polarisés et expriment l'ensemble des marqueurs des hépatocytes matures. De plus, les cellules Huh 7.5 présentent un défaut dans la voie de signalisation RIG-I/IFN impliqué dans la défense de la cellule et contribuant à la permissivité de cette lignée cellulaire pour le VHC (Sumpter *et al.*, 2005). Toutefois, les hépatocytes isolés *in vivo* perdent rapidement leurs caractéristiques de cellules différenciées lors de leur mise en culture *in vitro*. Cependant, le développement de nouveaux systèmes de culture des hépatocytes humains, basés notamment sur les co-cultures avec des fibroblastes, a permis de conserver les profils d'expression géniques de ces cellules durant plusieurs semaines *in vitro* (Ploss *et al.*, 2010).

Le VHC issu du sérum de patients s'est avéré capable d'infecter des cultures primaires d'hépatocytes humains ou de chimpanzés bien que montrant finalement une faible production d'ARN viral (Pour revue Bartenschlager *et al.*, 2004).

En revanche, les hépatocytes primaires se sont révélés permissifs à l'infection de virus de la souche JFH-1 produits en cellules Huh7, une infection ayant entraînée la production de particules virales infectieuses dans ces hépatocytes (Podevin *et al.*, 2010). Les hépatocytes primaires sont toutefois d'accès limité et représentent un modèle relativement compliqué à mettre en place, notamment par leur mode d'obtention et de préparation, leurs conditions de culture, ou leurs difficultés à être transfectés avec une efficacité satisfaisante.

D. Le cycle infectieux

1) L'entrée virale

Circulant dans le sang et infectant principalement les hépatocytes, le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé dont les mécanismes d'entrée ont pu être identifiés de façon précise dès lors que les modèles de propagation cellulaire ont été disponibles. Si les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont logiquement impliquées dans les mécanismes d'entrée, les lipoprotéines, découvertes associées au virus (Miyamoto *et al.*, 1992), sont également impliquées dans ce mécanisme.

La première étape de cette entrée virale consisterait en l'attachement du virus au pôle basolatéral de l'hépatocyte. Ce mécanisme ferait intervenir des glycosaminoglycanes (GAG), polysaccharides présents à la surface cellulaire, et plus particulièrement les héparanes sulfates (HSPG pour *heparan sulfate proteoglycans*). Des études réalisées à l'aide de HCVpp et HCVcc ont en effet démontré que la dégradation des héparanes sulfate inhibait l'attachement du virus aux cellules (Barth, 2003), les identifiant comme intervenant dans l'adhérence du virus aux hépatocytes, et ce par l'intermédiaire de E2 (Barth *et al.*, 2006) (**Figure 18₁**). Plus récemment, il a été proposé que l'apolipoprotéine E soit en réalité responsable de l'interaction entre les HSPG et le virus (Jiang *et al.*, 2012). Justement, la présence d'apolipoprotéine B et E à la surface du virus en ont fait des candidats légitimes comme acteurs de l'entrée virale. C'est ainsi que fut proposé l'intervention des Récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) pour la captation des virus par la cellule cible (Agnello *et al.*, 1999) (**Figure 18₂**). Une hypothèse confirmée par l'impact de la modulation de l'expression des LDLR sur l'infectiosité des virus issus de sera de patients infectés par le VHC (Molina *et al.*, 2007). En revanche, une étude plus récente a démontré que l'association entre les LDLR et les ApoE n'était pas essentielle à l'internalisation du virus mais impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Albecka *et al.*, 2012).

A ce stade, le virus au contact de la cellule peut interagir directement ou indirectement avec une multitude de facteurs cellulaires. Le premier récepteur découvert fut la tétraspanine CD81 capable de liaisons avec une forme soluble de la glycoprotéine E2 (Pileri, 1998). L'hétérodimère E1/E2 ayant une plus forte affinité que E2 seule, il a été suggéré que E1 participe à une conformation de E2 plus adéquate pour l'interaction avec CD81 (Cocquerel *et al.*, 2003). Par ailleurs, cette association entre CD81 et E2 a été montrée comme impliquée dans les mécanismes d'entrée précédant l'internalisation du virus (Koutsoudakis *et al.*, 2006) (**Figure 18₅**).

Des expériences réalisées en cellules HepG2, déficientes dans l'expression du récepteur CD81, ont démontré pour la première fois l'interaction entre E2 et le scavenger receptor BI (SR-BI) (Scarselli *et al.*, 2002) (**Figure 18₃**). Le récepteur SR-BI étant naturellement récepteur pour de nombreuses classes de lipoprotéines, son interaction avec les lipoprotéines de surface du virus dans les phases précoces de l'entrée virale a été démontrée (Dao Thi *et al.*, 2012). De plus, SR-BI interviendrait dans les phases tardives d'internalisation également en s'associant avec le domaine HVR1 de la seconde glycoprotéine d'enveloppe (Dao Thi *et al.*, 2012).

Les protéines des jonctions serrées claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN) ont également été identifiées comme facteurs d'entrée supplémentaires (Evans *et al.*, 2007 ; Ploss *et al.*, 2009) (**Figure 186-7**). Des études de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) et d'inhibition à l'aide d'anticorps spécifiques ont montré que la protéine CLDN1 forme un complexe avec le récepteur CD81 mais n'interagit pas directement avec E2 (Harris *et al.*, 2008; Krieger *et al.*, 2010). La formation d'un complexe CD81-CLDN1 est indispensable pour l'entrée du VHC, des kinases cellulaires permettant l'association entre ces deux co-récepteurs. En effet, l'inhibition de deux récepteurs tyrosines kinases (RTK) : l'EGFR et le récepteur Ephrine A2 (EphA2) réduit l'efficacité de l'entrée virale (Lupberger *et al.*, 2011). La transduction de cellules avec différents co-récepteurs a montré que contrairement à SR-BI et CLDN1, seule l'expression des protéines CD81 et OCLN humaines permettait une entrée efficace de pseudo-particules rétrovirales portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2 du VHC (Ploss *et al.*, 2009). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez des souris surexprimant les co-récepteurs humains ou leurs homologues murins. Ceci suggère que la restriction d'hôte lors de l'entrée virale chez la souris soit conférée par les co-récepteurs CD81 et OCLN (Dorner *et al.*, 2011).

Récemment, le récepteur au cholestérol Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1) a été identifié comme facteur d'entrée pour le virus. L'infection s'avère en effet bloquée *in vitro* suite à l'inhibition de l'expression de NPC1L1, qui interviendrait au cours de la phase post-attachement/Pré-fusion et dépendant du cholestérol, composant de la particule virale (Sainz *et al.*, 2012) (**Figure 188**).

L'association du virus avec ces co-récepteurs mène à leur internalisation par un mécanisme d'endocytose clathrine dépendant (Blanchard *et al.*, 2006). L'endocytose des complexes CD81-CLDN1 en présence de E1 et E2 a été démontrée par microscopie à fluorescence, suggérant un rôle direct de ces co-récepteurs pour l'internalisation des particules virales (Coller *et al.*, 2009; Farquhar *et al.*, 2012). L'enveloppe des particules virales internalisées fusionne ensuite avec la membrane des endosomes précoces. Cette fusion requiert un environnement acide et l'interaction des glycoprotéines avec CD81 (Ploss & Evans, 2012). Le virus est ensuite décapsidé, permettant la libération dans le cytoplasme du génome viral, un ARN de polarité positive pouvant être directement traduit par la machinerie cellulaire (**Figure 189**).

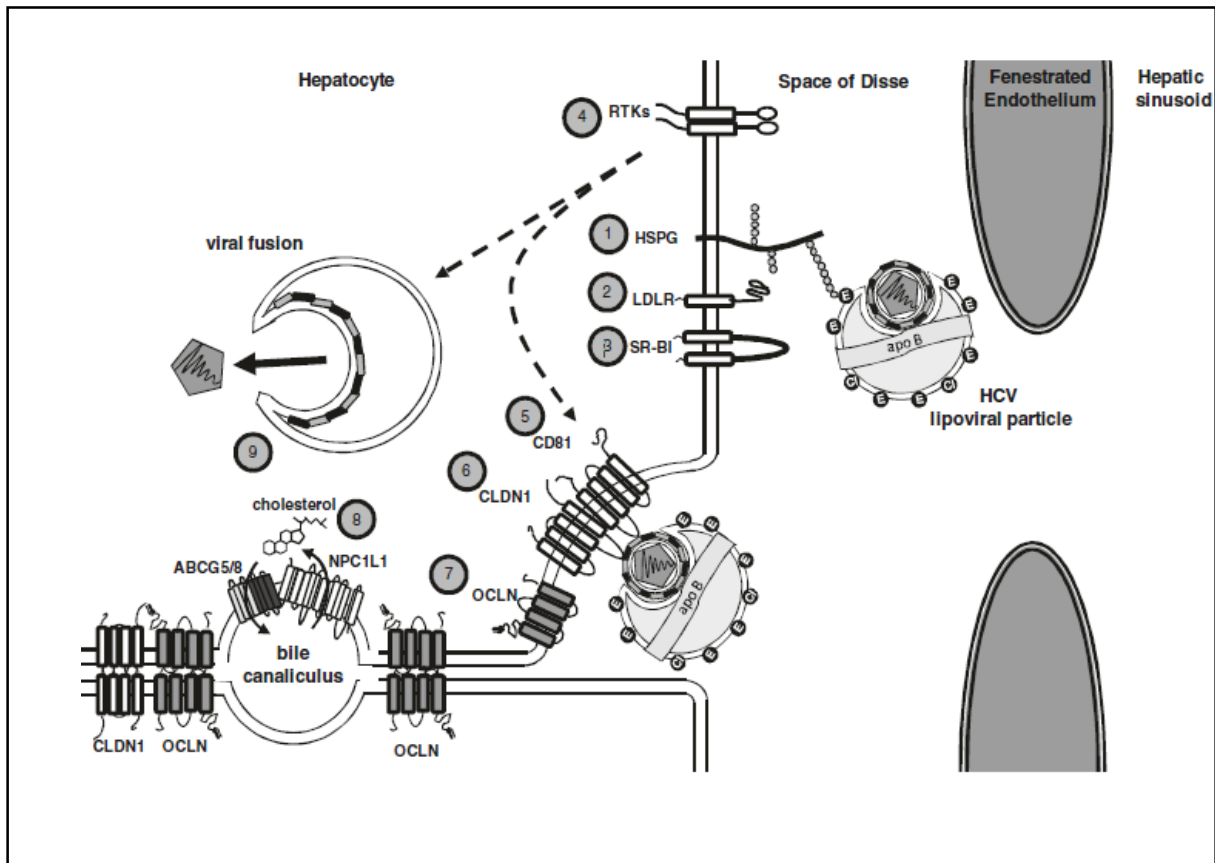


Figure 18. L'entrée virale (D'après Zeisel *et al.*, 2013)

2) Transmission Cellules-Cellules

Bien que le virus se propage initialement à travers le flux sanguin et infecte les hépatocytes naïfs, la transmission de virus entre cellules infectées et cellules naïves adjacentes est un phénomène décrit en tant que moyen d'infection (Timpe *et al.*, 2007). En effet, les capacités de cette voie à échapper au système immunitaire et à fonctionner pour tout génotype lui confèrent une efficacité plus grande que l'infection classique (Brimacombe *et al.*, 2010). Néanmoins, les acteurs sont semblables entre les deux mécanismes (revue dans Zeisel *et al.*, 2013). Si SR-B1 semble être indispensable à cette transmission (Meuleman *et al.*, 2012), CD81 s'avère être facultatif (Witteveldt *et al.*, 2009) et l'impact des LDLR reste à ce jour inconnu.

3) Traduction du génome

L'IRES du VHC initie la traduction de la polyprotéine précurseur en recrutant dans un premier temps la sous unité 40S ribosomal en s'affranchissant du mécanisme de balayage de l'ARN par le ribosome par l'intermédiaire de la coiffe 5' dont l'ARN est dépourvu (Otto & Puglisi, 2004; Reynolds *et al.*, 1996). Le complexe IRES/40S formé près du codon AUG s'associe ensuite au facteur eIF3 (*eukaryotic translation initiation factor*) et au complexe formé par eIF2, l'ARN de transfert initiateur (Met-ARN^{ti}) et une molécule de GTP pour former le grand complexe 48S (Ji *et al.*, 2004; Pestova *et al.*, 2001). Par action de l'eIF5 et l'hydrolyse GTP libérant les eIF, la sous unité 60S viendra se fixer au complexe 48S pour former le ribosome 80S fonctionnel pour la traduction (**Figure 19**) (Pestova *et al.*, 1998).

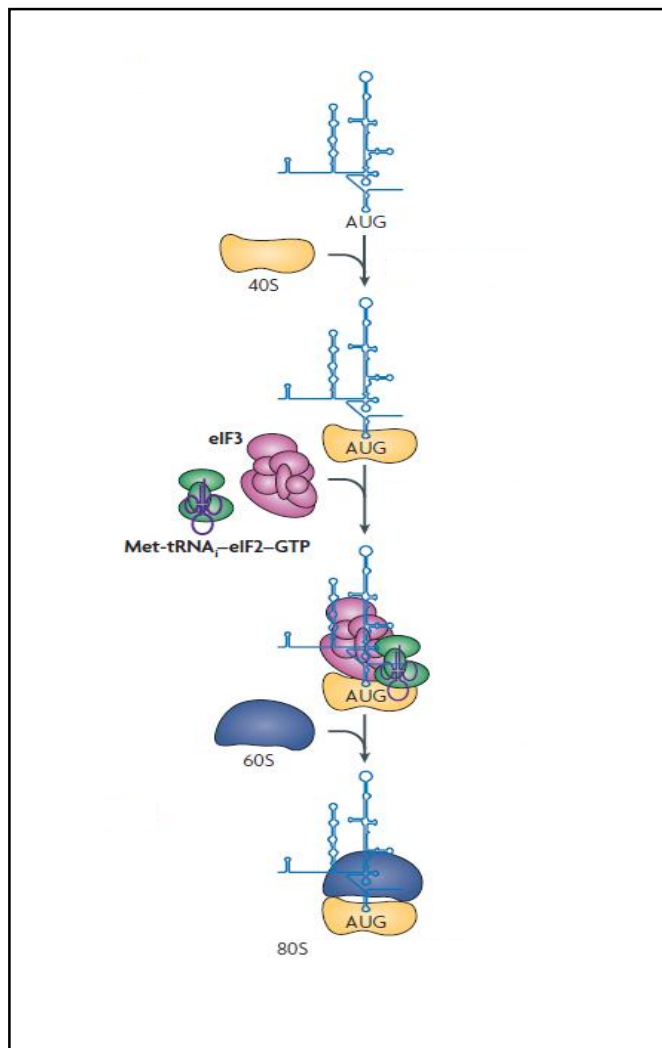


Figure 19. Formation du complexe d'initiation 80S
(D'après Fraser & Doudna, 2007)

4) Réplication du génome

La réplication de l'ARN du VHC est directement liée à l'activité polymérase ARN dépendante de la protéine NS5B. Capable de produire un brin ARN négatif à partir de l'extrémité 3' du génome, elle utilisera cette amorce pour produire les nouveaux brins d'ARN positifs (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). De concert avec ce mécanisme, l'activité hélicase de la protéine NS3 permet la séparation des brins négatifs et positifs (Revue Raney *et al.*, 2010), rendant libre ces derniers pour leur encapsidation ou leur traduction. Enfin, NS5A, par ses différents états de phosphorylation, module l'activité de la polymérase NS5B et interviendrait dans le transfert de l'ARN vers le site d'assemblage de par ses propriétés d'attachement à ce dernier (Evans *et al.*, 2004; Tellinghuisen *et al.*, 2005).

Une altération des membranes cellulaires apparaissant dans des cellules Huh 7 contenant des réplicons subgénomiques et nommé « Membranous Web » (MW) a été identifiée comme le site de réplication de l'ARN viral (**Figure 20A**) (Gosert *et al.*, 2003). Induit par NS4B et NS5A, le MW serait dérivé des membranes du RE et des endosomes précoces et se présente comme un réseau de membranes circonvolutées, précédemment observé en MET dans le foie de chimpanzés infectés (Egger *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2007; Romero-Brey *et al.*, 2012).

Au sein même de ce réseau complexe sont retrouvés différents éléments tels des membranes à double vésicules (DMV) constituants majeurs du MW, dérivées des membranes du RE, et probable site de la réplication (**Figure 20B**) (Romero-Brey *et al.*, 2012; Ferraris *et al.*, 2013) ou encore les vésicules à membranes multiples (MMV) résultant d'un sur-enroulement des DMVs ou de leur autophagie (**Figure 20C**), ce dernier mécanisme étant déclenché par NS5A et ayant déjà été suspecté pour la formation du Membranous Web (Ferraris *et al.*, 2010). Globalement, la présence de double membrane au sein du complexe de réplication jouerait un rôle protecteur contre la réponse anti-ARN double brin du système immunitaire de la cellule hôte (Lohmann, 2013).

Le rôle du métabolisme lipidique s'avère essentiel dans cette étape du cycle viral. Plusieurs études ont montré que la réplication est stimulée par présence d'acides gras saturés ou mono insaturés (Kapadia & Chisari, 2005) ou au contraire inhibée par des inhibiteurs de synthèse du cholestérol, de sphingomyéline et de la FAS (*Fatty Acid Synthesis*) (Aizaki *et al.*, 2004).

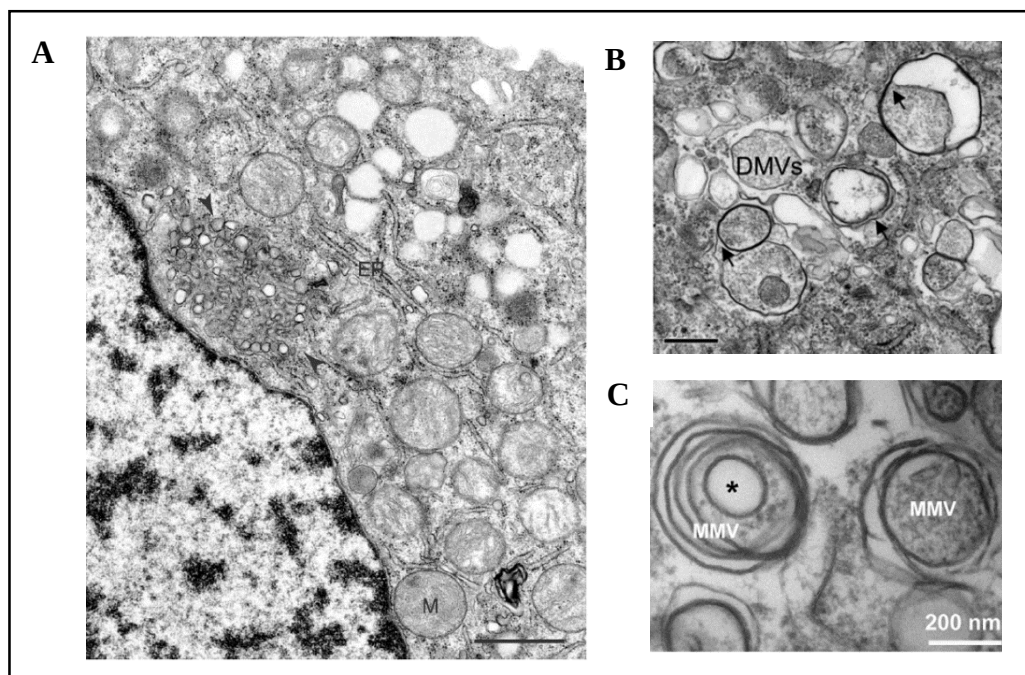


Figure 20. Le « Membranous Web »
(d'après Ferraris *et al.*, 2010; Gosert *et al.*, 2003; Romero-Brey *et al.*, 2012)

5) Assemblage de la particule

Les protéines structurales core, E1 et E2 sont les composants viraux des LVP et participent logiquement au processus d'assemblages des virions. Les premières études visant à caractériser les mécanismes impliqués dans la morphogenèse des particules virales se sont donc intéressées dans un premier temps à l'analyse de la localisation subcellulaire des protéines structurales, ainsi qu'à l'identification de leurs interacteurs.

Des études de microscopie à fluorescence et électronique ont montré que la protéine de capsid était retrouvée au niveau des membranes du RE, mais aussi à la surface des gouttelettes lipidiques. La localisation de la protéine de capsid dépendrait de son état de maturation puisque le clivage par la SPP, donnant naissance à la protéine de capsid mature (p21), a été montré comme nécessaire au trafic de cette protéine vers les gouttelettes lipidiques (Ait-Goughoulte, 2006; McLauchlan, 2002) et à la formation de particules infectieuses (Targett-Adams *et al.*, 2008). Par ailleurs, des expériences de mutagenèse sur la séquence de la protéine de capsid JFH-1 ont révélé la corrélation entre rupture de l'association core/GL et baisse de la production de particules infectieuses, démontrant le caractère prépondérant d'un trafic de la protéine de capsid JFH-1 vers les gouttelettes lipidiques lors des mécanismes d'assemblages (Boulant *et*

al., 2007; Miyanari *et al.*, 2007). En parallèle, il a été montré que la protéine NS5A était également distribuée à la périphérie des gouttelettes (Appel *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2002). De plus, des approches de double hybride et de co-immunoprécipitation ont révélé l'existence d'une interaction entre la protéine de capsid et NS5A (Gawlik *et al.*, 2014; Goh *et al.*, 2001; Masaki *et al.*, 2008). En outre, des mutations au sein du domaine D3 de NS5A (abolissant son recrutement au niveau des gouttelettes lipidiques ou son interaction avec la protéine de capsid) inhibent la production de particules virales, mettant en évidence l'implication de l'interaction de NS5A et de la protéine de capsid à la surface des gouttelettes lipidiques dans l'assemblage des particules virales (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence le rôle central de l'enzyme cellulaire diacylglycerol acyltransferase-1 qui, d'une part permettrait le recrutement de la protéine de capsid et potentiellement de NS5A à la surface des gouttelettes lipidiques, et d'autre part favoriserait les interactions entre ces deux protéines virales (Camus *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2011; Herker *et al.*, 2010). De plus, des études de double hybride et de co-immunoprécipitation ont démontré l'existence d'une interaction entre NS5A et ApoE (Benga *et al.*, 2010; Cun *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2004), apolipoprotéine présente à la surface des LVP et indispensable à l'assemblage des particules virales (Chang *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de l'interaction entre la protéine de capsid et NS5A, et la surface des gouttelettes lipidiques pourraient donc représenter une plate-forme pour les étapes précoces de l'assemblage des particules virales, en particulier en ce qui concerne la nucléation de la protéine de capsid autour de l'ARN viral délivré par la protéine NS5A (**Figure 21**).

Si les étapes précoces de l'assemblage semblent être localisées au niveau des gouttelettes lipidiques, il semble que les étapes plus tardives, constituées par l'acquisition des protéines d'enveloppe virale E1 et E2 soient localisées au niveau des membranes du RE. En effet, il a été montré que ces deux protéines associées en hétérodimères étaient retenues au sein des membranes du RE par leur domaines transmembranaires, et non sécrétées ou exportées en surface de la membrane plasmique (Dubuisson *et al.*, 1994; Rouille *et al.*, 2006). Bien que ces mécanismes n'aient jamais été observés sur le plan structural dans le système HCVcc, l'expression en système SFV de polyprotéines partielle du VHC, codant la protéine de capsid et les deux protéines d'enveloppe ont permis l'observation du bourgeonnement de pseudo-capsides du VHC au niveau des membranes du RE, suggérant que l'étape d'enveloppement aurait lieu au niveau de ces membranes (Blanchard *et al.*, 2003; Hourieux *et al.*, 2007; Roingeard *et al.*, 2008). Enfin, l'analyse de la localisation de la protéine de capsid de

différentes souches virales a montré que la proportion de protéine de capsid retrouvée à la surface des gouttelettes lipidiques ou au niveau du RE pouvait varier en fonction de la séquence de la protéine, une localisation accrue au niveau du RE étant corrélée avec une colocalisation plus importante avec E2, et permettant une production plus élevée de virions (Boson *et al.*, 2011; Shavinskaya *et al.*, 2007). Ces résultats ont par ailleurs suggéré que le recrutement des protéines structurales au RE, dont la protéine de capsid, pourrait être lié à une interaction spécifique avec les protéines p7 et NS2 (Boson *et al.*, 2011), ces protéines ayant par ailleurs identifiées comme étant indispensables aux mécanismes gouvernant l'assemblage des particules virales (Jones *et al.*, 2007).

Après bourgeonnement dans la lumière du RE, les particules enveloppées immatures subissent différentes modifications intracellulaires avant d'être secrétées dans le milieu extracellulaire. Bien que les mécanismes impliqués soient relativement peu caractérisés, plusieurs observations ont mis en évidence une étape de maturation des particules virales. Tout d'abord, contrairement aux hétérodimères E1-E2 présents dans la membrane du RE suite à la traduction de l'ARN viral, les glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface des virions sont liées de manière covalente par des ponts disulfures (Vieyres *et al.*, 2010). Ces résultats démontrent la formation de complexes multimériques covalents de E1-E2 à la surface des virions après leur bourgeonnement dans la lumière du RE. Par ailleurs, la présence de sucres complexes résistants au traitement par l'endoglycosidase H à la surface de E2 indique que les particules virales bourgeonnant dans la lumière du RE sont ensuite dirigées vers l'appareil de Golgi où elles subissent des mécanismes de maturation (Vieyres *et al.*, 2010). De plus, des analyses de localisation subcellulaire de la protéine de capsid en temps réel grâce à l'insertion d'une étiquette tétracystéine ont permis de mettre en évidence la mobilité de la protéine de capsid le long des microtubules après avoir quitté la surface des gouttelettes lipidiques, suggérant la transport des particules virales en cours de maturation au sein de vésicules, après leur passage dans le RE (Coller *et al.*, 2012; Counihan *et al.*, 2011). En accord avec ces données, l'étude des facteurs cellulaires impliqués dans la libération des particules par ARN interférence a mis en évidence le rôle de composants des voies de transport RE-Golgi et d'exocytose, tel que VAMP1 (Coller *et al.*, 2012). Par ailleurs, outre son rôle au cours d'une étape plus précoce de l'assemblage, la protéine p7 formant un canal ionique pourrait intervenir dans les phases tardives de l'assemblage en inhibant l'acidification des compartiments intracellulaires (Wozniak *et al.*, 2010). Cette même étude a montré qu'un mutant de p7 dont la fonction canal ionique est altérée, inhibe également la sécrétion de particules virales infectieuses et que ce

défaut peut être partiellement compensé par un traitement alcalin ou l'expression en *trans* de la viroporine M2 du virus de la grippe. L'activité de viroporine de p7 pourrait en effet permettre de limiter l'acidification des vésicules de transport et de sécrétion contenant les particules en cours de maturation, les protégeant ainsi d'un environnement acide susceptible d'induire des changements conformationnels délétères pour leur infectiosité (Wozniak *et al.*, 2010).

Une des caractéristiques notables des particules du VHC est leur association avec des lipoprotéines pour former des LVP. Il a par ailleurs été démontré que les particules virales produites en culture cellulaire présentaient une infectiosité spécifique inférieure à celles des virions produits en culture primaire d'hépatocytes humains, ou *in vivo* chez le chimpanzé. Ces différences d'infectiosité étaient également inversement corrélées à la densité des LVP (Lindenbach *et al.*, 2006; Podevin *et al.*, 2010). La voie de synthèse des VLDL étant altérée au sein de la lignée Huh7, l'ensemble de ces données suggère que l'association des particules virales avec des lipoprotéines au cours de leur morphogénèse est déterminante pour l'infectiosité des LVP (Lindenbach, 2013). De plus, l'inhibition de la synthèse des lipoprotéines dans des cellules Huh7 provoque une importante réduction de la production de particules virales infectieuses, démontrant l'implication de la voie de sécrétion des VLDL dans la morphogénèse des LVP (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007). Les VLDL sont des complexes protéolipidiques hydrosolubles composées d'un cœur hydrophobe de lipides neutres entouré d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol contenant des apolipoprotéines. La biogénèse des VLDL impliquerait notamment la fusion de pré-lipoprotéines faiblement lipidées avec des lipides présents dans la lumière du RE (Popescu & Dubuisson, 2010). Les micro-domaines du RE riches en lipides et situés à proximité des gouttelettes lipidiques représenteraient donc une plate-forme d'assemblage commune des VLDL et des particules virales, conduisant à la convergence de ces 2 voies et permettant la maturation des LVP. Les particules virales associées aux lipoprotéines pourraient ensuite être libérées dans le milieu extracellulaire selon les mécanismes non-cytolytiques de la voie de sécrétion des VLDL (Bartenschlager *et al.*, 2010).

L'assemblage des particules virales est donc un mécanisme complexe faisant intervenir non seulement les protéines structurales mais également différentes protéines NS impliquées ou non dans la répllication de l'ARN viral. L'ensemble des études présentées dans les paragraphes précédents permet de déduire un modèle hypothétique de morphogénèse des LVP du VHC, bien que des modèles alternatifs soient également plausibles et que les mécanismes précis mis en jeu restent encore aujourd'hui partiellement connus. Selon ce modèle, les gouttelettes lipidiques représenteraient une première plate-forme de pré-assemblage permettant

l'interaction des protéines de capsid et NS5A alors que la formation de la nucléocapside et son enveloppement se dérouleraient de manière concertée au niveau de la membrane du RE, à proximité d'une part des sites de réplication génomique et d'autre part des gouttelettes lipidiques. Des études ayant montré que la protéine de capsid était capable d'interagir avec l'ARN viral pour former des nucléocapsides *in vitro* (Klein *et al.*, 2004; Kunkel *et al.*, 2001), la rétention de protéines de capsid au niveau des gouttelettes lipidiques et donc à distance du génome viral pourrait ainsi empêcher l'assemblage prématuré de la nucléocapside. Sa relocalisation au niveau de zones de la membrane du RE, à proximité voire en contact avec des gouttelettes lipidiques pourrait faire intervenir de façon concertée les protéines p7 et NS2 (Boson *et al.*, 2011). La protéine NS2, pensée comme une plateforme d'assemblage des particules virales permettrait également le recrutement des protéines E1-E2 et NS3 au niveau des plateformes d'assemblage (Jirasko *et al.*, 2010; Popescu *et al.*, 2011). L'activité hélicase de la protéine NS3 pourrait être impliquée dans l'encapsidation de l'ARN viral, bien que seuls des résultats expérimentaux indirects suggèrent un tel mécanisme (Pour revue, Lindenbach, 2013). Les nucléocapsides ainsi formées bourgeonnent dans la lumière du RE et s'associent avec des lipoprotéines ; il s'en suivrait alors leur maturation et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire.

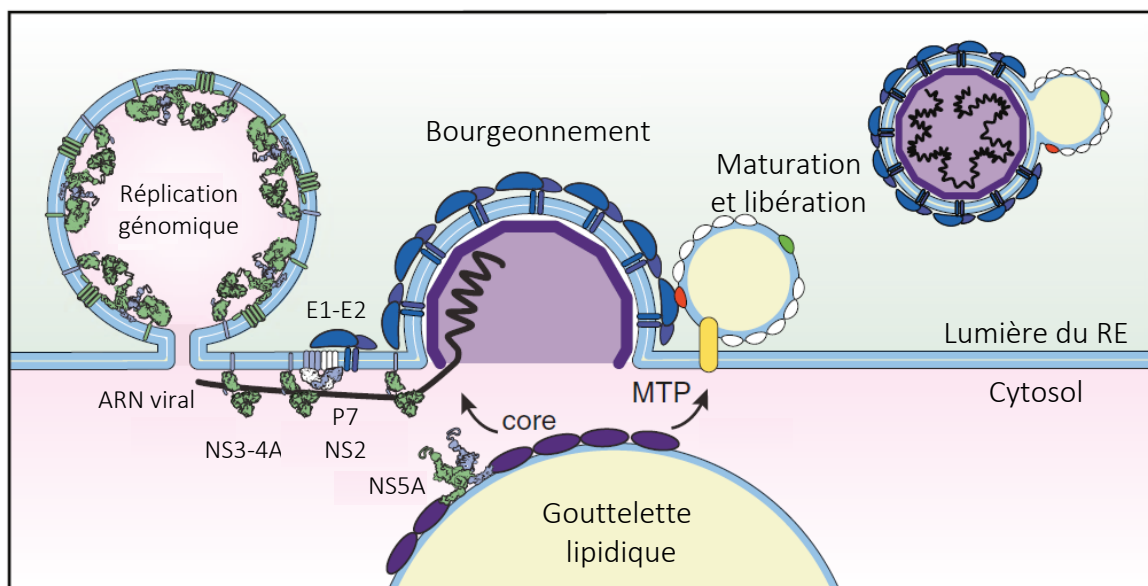


Figure 21. Modèle de la morphogénèse des lipo-viro-particules
(d'après Lindenbach, 2013)

Projets développés au cours de cette thèse

Ma thèse a été axée autour de trois projets principaux qui seront traités successivement dans la partie « Résultats » Page 89 :

Projet n°1 : Application de nouvelles techniques d'imagerie cellulaire à l'étude des mécanismes gouvernant la morphogenèse du virus de l'hépatite C (Page 91)

Ce premier projet a consisté à élaborer et exprimer des séquences de protéines capsides taguées destinées à évaluer le trafic de cette protéine pour étudier ses interactions avec les composants viraux et cellulaires au cours du cycle infectieux.

Projet n°2 : Recherche, analyse et étude de protéines potentiellement codées par l'ARN négatif du virus de l'hépatite C (Page 107)

Ce deuxième projet a eu pour but de rechercher dans les banques de données de séquences de VHC, mais aussi au sein de la souche JFH-1, la présence de cadres ouverts de lecture présents sur le brin négatif de l'ARN du VHC et susceptibles de coder des protéines jusque-là non identifiées dans le cycle du virus.

Projet n°3 : Etude de la protéine de capside du clone JFH-1 dans l'assemblage et la sécrétion du virus : identification de 10 résidus importants pour optimiser ces mécanismes (Page 127)

Ce dernier projet a consisté à réaliser un génome JFH-1 modifié possédant dix mutations dans la séquence codant la protéine de capside. La réplication de ce génome mutant a montré qu'il présentait des caractéristiques optimisées pour les phases d'assemblage et de sécrétion du virus.

Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes

A. Prédiction Bio-informatiques

1) Analyses effectuées dans le cadre du Projet n°2

Le site de base de données de séquences du VHC de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov>) a permis la récupération de toutes les séquences complètes de VHC dont 1014 séquences de génotype 1 et 53 de génotype 2. Ces séquences ont été importées et étudiées dans le logiciel de base de données Filemaker pro 10 en élaborant des scripts "maison". Chaque séquence a ainsi été convertie en ARN négatif puis des algorithmes ont été développés pour réaliser un screening de ces séquences à la recherche d'ORFs potentiellement présents avec un seuil inférieur fixé à 270 nucléotides minimum. Ensuite, les ORFs recensés ont été convertis en séquences protéiques puis exportés en fichier Fasta et analysés par les logiciels d'alignement ebiox (<http://www.ebioinformatics.org/ebiox/>) et seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>) utilisant l'algorithme Clustalw.

2) Analyses effectuées dans le cadre du Projet n°3

Les séquences des ARNs HCV ont été obtenues à partir de la base de données HCV de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov>) à l'aide de la fonction "alignment" du menu "background information". Seules les séquences complètes ont été retenues. Ces séquences ont ensuite été importées dans une base de données gérée par le logiciel Filemaker pro 10. Les traitements effectués sur les séquences tels la traduction *in silico*, les comparaisons etc... ont été réalisées avec les scripts appropriés développés sous Filemaker en association avec différents logiciels de bio-informatiques pour des questions spécifiques (Bioedit, Clustal w). Après réalisation des alignements de séquences protéiques, les séquences consensus ont tout d'abord été comparées aux trois séquences références de l'étude que sont le génotype 1a Dj (AF529293, décrit par

(Blanchard *et al.*, 2002), et les deux séquences de génotypes 2 JFH-1 (Wakita *et al.*, 2005) et HC-J6 (Okamoto *et al.*, 1991)

B. Plasmides

1) Production de protéines à l'aide du vecteur d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki (Commun aux trois projets)

Les premiers vecteurs défectifs dérivés du génome du virus de la forêt de Semliki (SFV) ont été élaborés en 1991 par le groupe de Garoff (Liljestrom & Garoff, 1991). Le vecteur pSFV1 (Invitrogen) est construit comme un réplicon ARN auto-amplifiable et possède une structure bicistronique de 11033 pb. Le premier cistron est constitué de la partie 5' du génome viral codant les quatre protéines non-structurales (nsP1 à 4) constitutives du complexe de réplication. En aval de cette séquence se trouve le second cistron constitué d'un site de clonage multiple *BamHI-XmaI-SmaI* permettant l'insertion d'un transgène à exprimer. Ce site d'insertion vient en réalité remplacer la séquence codant les protéines structurales du SFV et est suivi par une cassette de codons de fin de traduction dans les trois cadres de lecture possible. Les régions 5' et 3' non-codantes du SFV requises en cis pour le processus de réplication de l'ARN sont retrouvées de part et d'autre des deux cistrons. Enfin, une séquence promotrice de la SP6-ARN-polymérase a été insérée en amont de l'extrémité 5' du premier cistron afin de pouvoir initier la synthèse d'un ARN complet de polarité positive (ARN nommé 42S(+)) par transcription *in vitro*. Après transfection dans des cellules de mammifères, ces ARN recombinants coiffés *in vitro* vont être auto-répliqués par la réplicase nsP1-4 du SFV et permettre la production de protéines d'intérêt par l'intermédiaire d'un ARNm secondaire sous génomique nommé 26S(+).

PCR d'assemblage

Les amorces ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer Premier (Biosoft International). Plusieurs PCR ont été réalisées, chacune dans le but d'amplifier une partie de la séquence de la protéine désirée tout en lui insérant les modifications souhaitées (Tag, mutations, sites de restriction...)

Les amorces amplifiant les parties 5' et 3' de la séquence de la protéine d'intérêt sont créées de façon à apporter un site de restriction *Bam*H1 et respectivement un codon initiateur et un codon STOP.

Les amplifications ont chacune été réalisées dans un mélange réactionnel de 50 µL contenant 100 ng du plasmide matrice; 10nM de chacun des dNTPs, 7.5 pmol de chacune des amorces sens et antisens, 1 unité de taq polymérase Phusion (Finnzimes) et 10 µL de tampon 5X-Phusion HF (Finnzimes). La réaction, effectuée en thermocycleur « iCycler » (Biorad), a consisté en une dénaturation de 10 secondes à 98°C, une hybridation à 70°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Cette amplification a été suivie d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium (BET), puis les amplicons ont été découpés sur gel et purifiés à l'aide du Kit Extract II (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant.

Après une électrophorèse de contrôle permettant de quantifier approximativement les purifications sur gel, une quantité égale des produits purifiés a été utilisée pour générer la séquence entière de la protéine étudiée. En effet, les amplicons ont été générés de façon à se chevaucher et ainsi reconstituer la séquence de la protéine complète. Dix cycles d'hybridation ont d'abord été réalisés sans amorces de façon à permettre l'obtention de la séquence nucléotidique complète. 7.5 pmol des amorces terminales ont ensuite été rajoutés avant de poursuivre par une amplification de 20 cycles. Le fragment attendu a pu être extrait et purifié sur gel d'agarose comme expliqué précédemment. Cette séquence a ensuite été adénylée puis clonée dans le vecteur pGEMT-Easy® (Promega). Puis un séquençage à l'aide du système « BigDye Terminator Mix v.3.1 » (Applied-Biosystems) a permis de confirmer la présence de notre séquence avec toutes les modifications désirées.

Clonage en pSFV1

12 µg de vecteur pSFV1 ont été digérés par *Bam*HI pendant 1h30 à 37°C puis déphosphorylés par 30 unités de Calf Intestin Phosphatase (CIP, Biolabs) pendant 1h30 à 37°C. Le plasmide linéarisé/déphosphorylé (100µL) a été purifié par extraction au phénol/chloroforme (100µL) puis précipité par 300 µL d'éthanol absolu à -20°C en présence de 15 µL d'acétate d'ammonium 7.5 mM. Le culot d'ADN a ensuite été lavé à l'éthanol 70% (500µL), séché à température ambiante pendant 20 min puis resuspendu dans 15 µL d'eau stérile.

En parallèle, les fragments insérés en pGEMT ont été libérés par restriction avec l'enzyme *Bam*HI puis la ligation a été réalisée avec le plasmide pSFV1 linéarisé. Après incubation, le mélange a été utilisé pour la transformation de bactéries chimiocompétentes.

L'ADN a ensuite été amplifié et extrait à partir de plusieurs colonies par techniques de minipréparations. La présence des inserts a été vérifiée par restriction enzymatique avec *Bam*HI et le sens du clonage a été déterminé en réalisant une PCR spécifique, à l'aide de l'amorce 5' de la séquence insérée et d'une amorce 3' située dans la séquence du vecteur pSFV1 en aval du site de clonage (as-pSFV1-7850, 5' AAGGCCCCCAGACCACCCG AG 3'). Dans le cas d'un insert correctement positionné la réaction de PCR conduit à l'amplification de l'insert, dans le cas contraire aucun produit n'est obtenu. Puis, de façon à obtenir et conserver les constructions en grande quantité, les minipréparations des plasmides sélectionnés ont été amplifiées par maxipréparations.

Projet n°1

a) Synthèses des séquences de capsides taguées

Les séquences de capsides taguées (**Figure 22**) ont également été réalisées à l'aide de plusieurs PCR et PCR d'assemblage comme décrites précédemment et dont les amorces pour un clonage en pSFV sont présentées **TABLEAU II**.

Concernant les séquences de capsides taguées ayant comme objectif futur d'être clonées au sein du génome **JFH-1 bicistronique**, une seconde version de ces séquences a été réalisée à l'aide des amorces alternatives présentées dans le **TABLEAU III**.

Tableau II: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines de capsidetaguées, en système SFV	
Numéro	Séquences
1	GT <u>GGATCC</u> TGCACCATGAGCACGAATCCT
2	CGGTTCCATGCAGCAGCCCGGGCAGCAGTTCAGAAATCTT
3	TTTCTGAACTGCTGCCCCGGGCTGCTGCATGGAACCGGGCGGCGGCCAGATCG TTGGCGGAG
4	AA <u>GGATCC</u> GATAGCAGAGACCGGAACGG
5	TTTCTGAACTGCTGCCCCGGGCTGCTGCATGGAACCCGGTTTCCCCTTTCTAT CTTCTGC
6	GGGTTCCATGCAGCAGCCCGGGCAGCAGTTCAGAAATAGGTTCCCTGTTGCA TAATTAACCCCGTCC
7	AGGATCCATGT <u>TTTCTGAACTGCTGCCCCGGGCTGCTGCATGGAACCG</u> AGCAC AAATCCTAAACCTC
8	CCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCCCAGGAGGGGCGAGAGCC
9	CTCGCCCCTCTGGGGCCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
10	CGATGACTTTACCCACGTTCTTGTAACAGCTCGTCC
11	GGACGAGCTGTACAAGAACGTGGGTAAAGTCATCGAC
12	CGCCCTTGCTCACGGGCCAGGGGCGACCTGGT
13	AGGTCGCCCCTGGCCCGTGAGCAAGGGCGAGGA
14	CCCTCATTCCCATATAGCTTGTAACAGCTCGTCCATGC
15	GGACGAGCTGTACAAGCTATATGGGAATGAGGGAC

Les séquences sont notées de 5' vers 3'

Les séquences soulignées correspondent au site de restriction *Bam*HI (GGATCC), *Nde*I (CATATG) et *Bst*EII (GGTCACC)

Les séquences bleues correspondent à celle de la capsid, les vertes à celle de la GFP, et rouges à celle du FLAsH/ReAsH

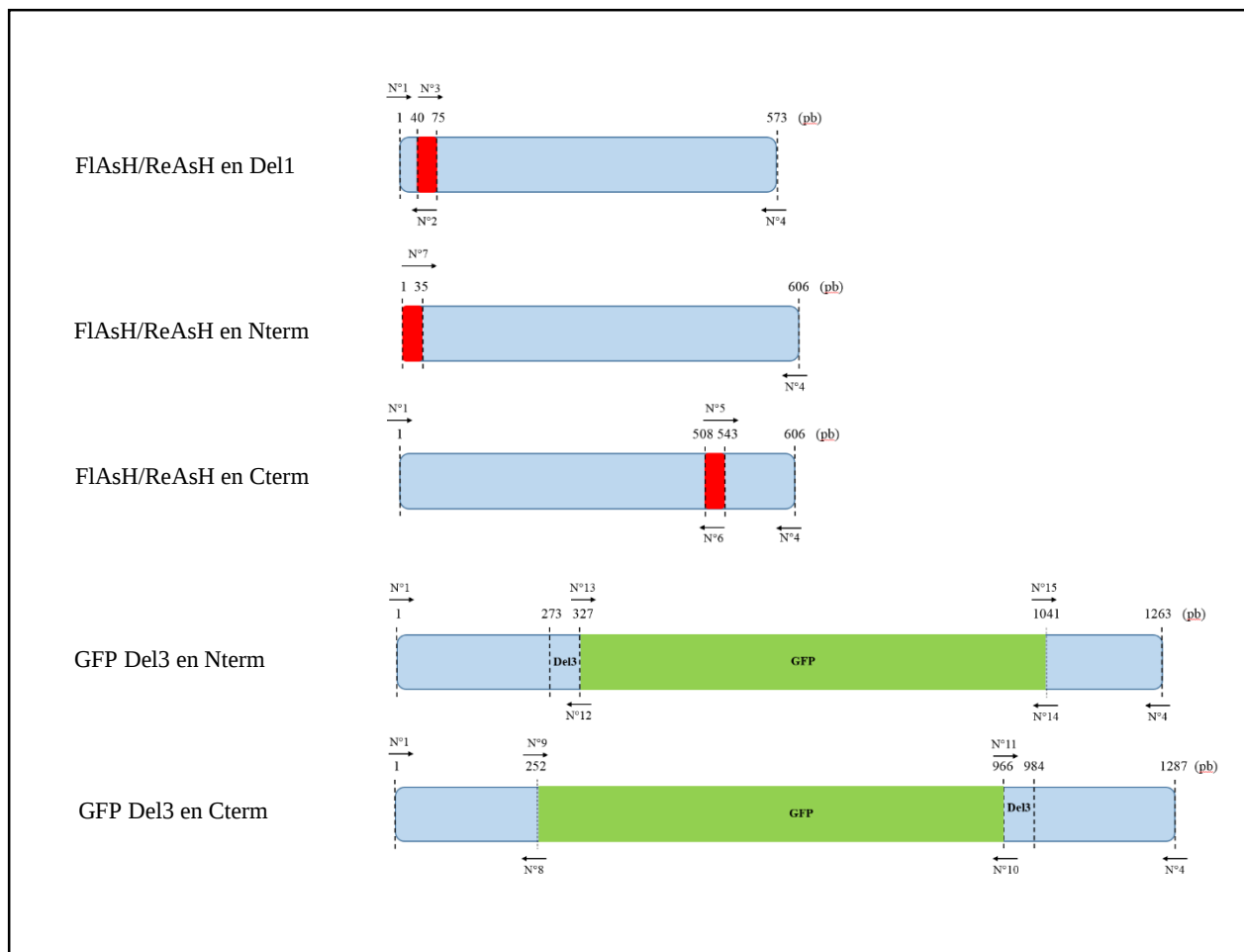


Figure 22. Représentation des séquences de capsides taguées et des amorces utilisées pour leur conception

Les amorces indiquées sont référencées tableau II et III

Tableau III: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines de capside taguées en système JFH-1	
Numéro	Séquences
1	GGCCACAACCTTCGAAGTCGAC <u>CATATG</u> AGCACAATCCTAAACC
4	TT <u>GGTCACC</u> ATGTAGCTGCTACTGGTATTCTTCACCTGGGCAGCAGAGA CCGGAACGGTGATG
7	GGCCACAACCTTCGAAGTCGAC <u>CATATG</u> TTTCTGAACTGCTGCCCGGGC

Les séquences sont notées de 5' vers 3'

Les séquences soulignées correspondent au site de restriction *NdeI* (CATATG) et *BstEII* (GGTCACC)

Les séquences bleues correspondent à celle de la capside et rouges à celle du FlAsH/ReAsH

Projet n°2

b) Synthèse des séquences d'ORFs tagués

Les différents ORFs exprimés dans des cellules eucaryotes ont été obtenus par PCR ou par commande d'un gène de synthèse auprès d'un fournisseur (Genscript). Ces différentes constructions ont été taguées (tag HA et/ou tag Flag) pour permettre leur détection en western blot ou leur immuno-capture en technique ELISA. Une construction de protéine de capsid du VHC taguée a également été élaborée comme témoin positif au cours des différentes manipulations. Les séquences FLAG-ORF2-HA ; HA-ORF2-FLAG ; FLAG-ORF2 ; ORF2-FLAG ; FLAG-ORF3-HA et FLAG-CORE, ont été amplifiées à partir du clone JFH-1 (**Tableau IV**), respectivement par les amorces A et B; l'amorce C et D; l'amorce A et l'amorce E; l'amorce F et D ; l'amorce G et H; amorce I et J.

Les séquences FLAG-ORFc-HA ; HA-ORFc-FLAG ; FLAG-ORFc et ORFc-FLAG ont été construites à partir d'un gène de synthèse (commandé auprès de la société Genscript) basé sur la séquence EU155214 représentative de l'ORFc du génotype 1 avec ajout d'un tag FLAG en partie Nterminale et un tag HA en partie Cterminale. Ces constructions ont été amplifiées (**Tableau IV**) respectivement par l'amorce K et L; l'amorce M et N ; l'amorce K et O et l'amorce N et P.

Projet n°3

c) Construction du plasmide pSFV1-S8

Elaborée par une technique de PCR d'assemblage, la séquence de capsid mutée « Core S8 » a été obtenue en utilisant comme matrice de départ la séquence codant la protéine de capsid issue du clone JFH-1 et les amorces décrites dans le **Tableau V** afin d'introduire les substitutions suivantes : E20Q – T48A – A75S – R81Y – L91C – S145G – A147V – V151L – F172C – P173S.

Tableau IV: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse des protéines d'intérêts taguées en système SFV

Numéro	Séquences
A	AA <u>CCCGGG</u> ATG <u>GACTACAAGGACGACGATGACAAG</u> GCCGCGCAGAT GACC
B	AA <u>CCCGGG</u> CTAAGCATAATCAGGAACATCATAAGGATACCAAG CTACGGTGTGCGCC
C	AA <u>CCCGGG</u> ATGTATCCTTATGATGTTCTGATTATGCTGCCG CGCAGATGACC
D	AA <u>CCCGGG</u> CTA <u>CTTGTCATCGTCGTCCTTGTA</u> GTCCCAAGCTACGGTGTG
E	AA <u>CCCGGG</u> CTACCAAGCTACGGTGTG
F	AA <u>CCCGGG</u> ATGGCCGCGCAGATGACC
G	AA <u>GGATCC</u> ATG <u>GACTACAAGGACGACGATGACAAG</u> AAAT CGATGGATTTGG
H	AA <u>GGATCC</u> CTAAGCATAATCAGGAACATCATAAGGATACCAAGCTGAGCTGGCAACAAGA CTC
I	<u>GGATCC</u> ATG <u>GACTACAAGGACGACGATGACAAG</u> AGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAA
J	<u>GGATCC</u> CTACTAAGCAGAGACCGGAACGGTGATGC
K	<u>GGATCC</u> ATG <u>GACTACAAGGACGA</u>
L	<u>GGATCC</u> CTAAGCATAATCAG
M	<u>GGATCC</u> ATGTATCCTTATGATGTTCTGATTATGCTGCGGGCA GCAGATTGAC
N	<u>GGATCC</u> CTA <u>CTTGTCATCGTCGTCCTTGTA</u> GTCCCA GGA GTTCGATGA
O	<u>GGATCC</u> CTACCAGGAGTTCGATGA
P	<u>GGATCC</u> ATGGCGGGCAGCAGATTGACCAGGTCCTCT

Les séquences sont notées de 5' vers 3'

Les séquences soulignées correspondent au site de restriction *Bam*HI (GGATCC) et *Xma*I (CCCGGG).

Les séquences bleues correspondent à celle du tag HA et rouges à celle du tag FLAG.

Tableau V: Séquences des amorces nécessaires à la synthèse de la protéine de capsid S8, en système SFV	
Nom	Séquences
Sens E20Q	ccaaccgtcgcccacaagacgttaagtccccg
Antisens E20Q	cgggaacttaacgtcttgtgggcgacggttggtg
Sens T48A	ggttgggtgtgcgcgcgacaaggaaaacttcg
Antisens T48A	cgaagttttccttgtcgcgcgcacaccaacctggg
Sens A75S	cgctccactggcaagagctggggaaaaccagg
Antisens A75S	acctggttttccccagctcttgccagtggagcg
Sens R81Y	ggggaaaaccaggttaccctggcccc
Antisens R81Y	ggggccaggggtaacctggttttcccc
Sens L91C	ggaatgagggatgcggctgggcagg
Antisens L91C	gcccagccgcatcctcattcc
Sens S145G - A147V - V151L	gtaggcgccccgcttgggtggcgctgccagagctctcgcgcacggcgtag
Antisens S145G - A147V - V151L	ctcacgccgtgcgcgagagctctggcgacgccaccaagcggggcgctacg
Sens F172C - P173S	acagggaaacctaccgggttgacgttttctatcttctgc
Antisens F172C - P173S	gcaagaagatagaaaagctgcaaccgggtaggttcctg

2) Plasmides codant les ADNc des ARNs du VHC (Commun aux trois projets)

Projet n°1

- Le plasmide **pJFH-1 bicistronique** a été construit en plusieurs étapes. Tout d'abord, une cassette « Core1-IRESecmv-Core2 » a été produite par PCR d'assemblage à l'aide des amorces décrites dans le **Tableau VI** puis clonée dans le vecteur navette pCR TOPO 2.1.

En parallèle, une cassette « Core → NS2 » a été extraite du génome JFH-1 par les enzymes *EcoRI* et *NotI* pour un clonage en vecteur navette pCR TOPO 2.1. La séquence de capsid de ce dernier plasmide a ensuite été retirée par les enzymes *BmtI* et *BstEII* pour être remplacée par la séquence « Core1-IRESecmv-Core2 » préalablement extraite de son vecteur navette par les mêmes enzymes. Le résultat de la ligation, un vecteur pCR TOPO 2.1 contenant une cassette « Core1-IRESecmv-Core2 → NS2 », a subi une digestion par *EcoRI* et *NotI* pour extraire cette cassette et la cloner en plasmide pJFH-1 dont la séquence « Core → NS2 » a précédemment été extraite à l'aide des enzymes *EcoRI* et *NotI*.

Tableau VI: Séquences des amorces nécessaires à l'élaboration de la cassette Core1/Ires/Core2

Nom	Séquences
S- <i>BmtI</i> -ATG-Caps	ACT <u>GCTAGC</u> CGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCTTGTGGTAC TGCCTGATAGGGCGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGAC CGTGCAACCATGAGCACAAATCCTAAACC
AS-Core1-MCSEMCV	<u>GAGG</u> CGATCGCACGCGTGCCGGCCGCGGTCCTACTAAGCAGAGACCGGAACGG TGATG
S-MCS-EMCV	TAGTGACCGCGCCGGCCACGCGTGCGATCG <u>CCTCTCCCTCCCCCCCCCTAAC</u> G
AS-EMCV-Core2-WK	GGTTTAGGATTGTGCTCATATGTCGACTTCGAAGGTTGTGGCCAT
S-EMCV-MCS-Core2	<u>GGCCACAACCTTCGAAGTCGACATATG</u> AGCACAAATCCTAAACC
AS- <i>BstEII</i> -Core	<u>TTGGTCACCATGTAGCTGCTACTGGTATTCTTCACCTGGGCAGCAGAGACC</u> GGAACGGTGATG

Toutes les séquences sont écrites de 5' vers 3'

Les séquences soulignées correspondent aux sites de restrictions *BmtI* (GCTAGC), *NdeI* (CATATG) et *BstEII* (GGTCACC). Les séquences en bleu correspondent à des séquences de la capsid, en orange à celle de l'IRES EMCV et en violet à celle de la protéine E1

Projet n°2

- Le plasmide **pJFH-1/3STOP.ORF2** contient l'ADNc du génome JFH-1 au sein duquel trois mutations ont été insérées à l'aide des amorces décrites **Tableau VII**. Ces trois mutations ont la particularité d'être silencieuses pour le brin positif de l'ARN viral mais introduisent trois codons STOP au sein de la séquence du brin négatif et repartis le long de la séquence « ORF2 » décrite précédemment.

Tableau VII: Séquences des amorces nécessaires à l'élaboration du génome JFH-1/3STOP.ORF2	
Nom	Séquences
S-Mut1-5939-wk	CTGGTGGACATCCTGGCAGGCTATG
AS-Mut1-5939-wk	GAAATGCCCCGCACCATAGCCTGCCA
S-Mut2-5615-Wk	CCCAGGACATTCAACCCGCTATGCA
AS-Mut2-5615-WK	GCATAGCGGGTTGAATGTCCTGGGC
S-Mut3-5393-Wk	CTGGCAGCCGTCGCCGCCTATTGCC
AS-Mut3-5393-WK	GCAATAGGCGGCGACGGCTGCCAGG

Projet n°3

- Le plasmide **pJFH-1** (AB047639) contient l'ADNc de la souche JFH-1 du VHC de génotype 2a (Wakita *et al.*, 2005), suivi d'un site *XbaI*. Le plasmide pJFH-1 nous a été fourni par le Dr. Takaji Wakita.
- Le plasmide **pFL-J6/JFH-1** est constitué des régions core/NS2 de la construction pJ6CF intégrées au réplicon sous génomique pSGR-JFH-1 afin d'obtenir le génome entier FL-J6/JFH-1. Le plasmide pFL-J6/JFH-1 nous a été fourni par le Dr. Charles Rice.
- Le plasmide **pS8/JFH-1** contient l'ADNc de la souche JFH-1 possédant les 10 substitutions dans la séquence de la protéine de capsid S8 décrite précédemment.
- Le plasmide **pJFH-1/GND** contient l'ADNc de la souche JFH-1 avec trois mutations sur la séquence de la polymérase NS5B (GlyAspAsp > GlyAsnAsp) rendant ce génome inapte à la réplication.

C. Transcriptions *in vitro* (Commun aux trois projets)

1) pSFV1

Douze microgrammes de chaque plasmide pSFV1 contenant la séquence à exprimer, ainsi que le plasmide témoin pSFV3, ont été linéarisés avec 12 unités d'enzymes *SpeI* pendant 90 minutes à 37°C dans un volume réactionnel de 50 µL. L'ADN linéaire a été purifié par extraction phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Après séchage, le culot d'ADN a été repris dans 20 µL d'eau stérile puis 1 µg de cet ADN linéaire a été transcrit *in vitro* pendant 90 minutes à 40°C dans 50 µL de mélange réactionnel en présence de 1 mM de rATP, rUCP, rCTP et rGTP (New England Biolabs), de 5 µL d'analogue de coiffe m7G(5')ppp(5')G 10 mM (New England Biolabs), 80 unités d'inhibiteur de ribonucléase et 60 unités de SP6 ARN polymérase (New England Biolabs). Après transcription, la qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au BET. Les ARN ont été aliquotés par 30 µL et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2) Génomes viraux

Les ADN plasmidiques contenant les ADNc viraux (10µg) ont été linéarisés par 40 unités de *XbaI* (New England Biolabs) puis traités par 10 unités de nucléase Mung Bean (New England Biolabs) pendant 30 minutes à 30°C. Après purification par extraction phénol/chloroforme puis précipitation à l'éthanol, l'ADN linéarisé est resuspendu dans 20 µL d'eau. La qualité et la quantité d'ADN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

1 µg d'ADN purifié a été utilisé pour la transcription *in vitro* dans un volume final de 20 µL à l'aide du kit *T7 RiboMAX Express Large Scale RNA production system* (Promega) selon les instructions du fournisseur. La matrice ADN est ensuite éliminée par un traitement à 1U/µL de DNase fournie dans le kit. L'ARN transcrit est purifié par passage en colonnes de silice (kit RNA Clean Up, Macherey-Nagel) puis resuspendu dans 20 µL d'eau stérile. La qualité de l'ARN a été vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse et la quantité évaluée par densité optique. Les ARN transcrits ont été conservés à -80°C jusqu'à la transfection des cellules.

D. Transfection par électroporation (Commun aux trois projets)

A confluence du tapis cellulaire, les cellules ont été trypsinées, lavées, centrifugées 10 minutes à 1500 rpm puis resuspendues dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, Gibco) à la concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules/mL pour les BHK-21 et FLC4 et $5 \cdot 10^6$ cellules/mL pour les cellules Huh 7.5. Les transfections ont été effectuées en transférant 1 mL de la suspension cellulaire en présence de 28 µL d'ARN SFV ou 20µg d'ARN génomique de VHC dans une cuve d'électroporation (0.4 cm entre les électrodes). L'électroporation a été réalisée par une impulsion électrique de 350V, 750 µF (Electroporateur GenePulser Xcell™, Biorad), puis les cellules ainsi transfectées ont été immédiatement mises en culture.

E. Culture cellulaire (Commun aux trois projets)

1) Cellules Huh 7.5

Les cellules Huh 7.5 sont dérivées d'un clone cellulaire de la lignée Huh 7 d'hépatoblastome humain dont l'ARN sous-génomique du VHC de génotype 1b autorépliatif, qu'il hébergeait de façon stable, a été éliminé par traitement à l'IFN. Le clone cellulaire Huh 7.5 s'est avéré particulièrement adapté à la production de virus JFH-1 après transfection ou infection (Blight *et al.*, 2002). Les cellules Huh 7.5 ont été fournies par l'équipe du Dr. Charles Rice. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium, Invitrogen*) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, ATGC) ,1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, Gibco) à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂.

2) Cellules BHK-21

Les cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) sont des cellules de rein de hamster nouveau-né couramment utilisées avec le système d'expression dérivé du SFV pour leur grande facilité de transfection et la grande efficacité de ce vecteur dans ces cellules. Elles sont cultivées en milieu GMEM (*Glasgow Minimum Essential Medium, Gibco*) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, Gibco) et 8% de tryptose phosphate (Sigma) à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂.

3) Cellules FLC4

Les cellules FLC4 (Functional Liver Cells) sont des cellules hépatocytaires humaines utilisées pour l'expression du vecteur SFV permettant une meilleure observation des gouttelettes lipidiques et des marquages réalisés en immunofluorescence. Les conditions de culture sont identiques à celles des cellules Huh 7.5.

F. Analyse de l'expression protéique

1) Immunocytochimie

Les cellules BHK-21 et FLC4 transfectées sont cultivées sur lamelles de verre 12 mm pendant 16h, les cellules Huh 7.5 le sont jusqu'au jour d'étude post transfection désiré. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées une heure dans du paraformaldéhyde 4%. La fixation a été stoppée par une incubation d'une heure dans une solution dite de neutralisation (PBS, glycine 0.1%) puis les cellules ont été perméabilisées par action d'un mélange constitué de PBS, saponine 0.05%, BSA 0.2%. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt puis lavées 20 minutes dans du PBS et incubées 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome désiré avant un dernier lavage de 20 minutes au PBS. Les cellules ont été montées entre lame et lamelle en présence de 10 μ L d'un milieu de montage composé de glycérol 5% (500 μ L), DABCO 2.5% (0.25g), tampon Tris/HCl pH 8.8 (25 mM au final), PVA 10% qsp 10mL. Les lames ainsi obtenues ont été observées sur un microscope confocal de type Olympus fluoview FV500 (Olympus).

2) Western-blotting et immuno-empreinte

Les cellules à analyser ont été traitées avec un tampon de lyse (1% de NP40, EDTA 1mM, Tris 1M [pH 8]) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs d'antiprotéases (Bio Basic Inc.). Après dénaturation, les lysats cellulaires issus de la transfection ont été soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide 15% (Sigma) pendant deux heures à 30 mA (Mini Protean III, Biorad). Ensuite, un électrotransfert du gel a été réalisé en tampon TG 1X (Tris 0.25M, glycine 1.92M, éthanol 20%) sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences) durant 1h30 à 90V. Après saturation de la membrane par contact rapide avec le tampon de blocage (PBS+ Lait 0.5%), cette membrane a ensuite été mise en contact avec l'anticorps primaire souhaité dilué dans le tampon de blocage pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages en tampon TBS, la membrane a été incubée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans le tampon de blocage. Enfin, après 3 lavages de 10 minutes en tampon TBS, la révélation a été réalisée avec un système de détection chimioluminescent ECL (GE Healthcare) et transfert du signal sur film (Kodak).

3) Microscopie électronique à transmission

Les cellules transfectées ont été resuspendues dans un tampon fixateur constitué de tampon phosphate 0.1 M (pH 7.2) contenant 4% de paraformaldéhyde et 1% de glutaraldéhyde. Les cellules ont ainsi été incubées pendant 48h à 4°C. Après un rinçage en tampon phosphate 0.15M, les cellules ont été post fixées à l'aide de tétroxyde d'osmium 1% en tampon phosphate 0.3M pendant une heure, avant d'être déshydratées par trempage dans des bains d'éthanol de titres croissants. Après un lavage dans l'oxyde de propylène-résine/Epon, les cellules ont été incubées 24 heures à 60°C pour permettre la polymérisation de la résine. Les coupes ultra-fines de blocs ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Reichert Scientific Instruments) et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être observées au microscope électronique à transmission (JEOL 1011, Tokyo).

Pour les immunomarquages de la protéine de capsid, une partie des coupes ultra-fines a été traitée 10 minutes avec du peroxyde d'hydrogène 10% afin de dissoudre la résine polymérisée. Après plusieurs lavages au PBS, les grilles ont été incubées 90 minutes à température ambiante avec l'anticorps C7.50 dilué au 1/50^{ème} dans du PBS supplémenté de BSA 1%. Les grilles ont ensuite été lavées plusieurs fois au PBS puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué à des billes d'or (15 nm de diamètre, British Biocell International) dilué au 1/40^{ème} dans du PBS. Les coupes ont été à nouveau lavées au PBS puis fixées dans du PBS/glutaraldéhyde 4% et contrastées comme décrit précédemment.

4) Dosage de la protéine de capsid (Lié au projet n°3)

Le dosage de la protéine de capsid à partir de lysats cellulaires ou de surnageants infectieux a été réalisé par dosage immunologique à chimioluminescence de façon automatisée (Architect HCV Ag ; Abbott). Concernant les lysats, ils ont été obtenus après trypsination des cellules, lavage en PBS et lyse du culot par un tampon « Tris pH 8 1M, EDTA 1mM et NP40 1% » complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Phénylméthylsulfonyl fluoride 1mM, Aprotinine à 2mg/mL et Leupeptine à 2 mg/mL). Après centrifugation des débris cellulaires, les lysats ont été dilués en série puis dosés.

G. Evaluation des titres infectieux (Lié au projet n°3)

Les surnageants infectieux ont été dilués en série de 10 en 10 en DMEM complet et utilisés pour infecter 10^4 cellules Huh 7.5 naïves présentes par puit d'une plaque P96 et ceci en triple exemplaire. Le niveau d'infection a été déterminé 3 jours post infection par immunofluorescence dirigée contre la protéine de capsid. Le titre viral est ensuite exprimé en unité formant colonie (FFU : Focus Forming Units) par millilitre de surnageant (FFU/mL) déterminé par le nombre d'amas cellulaire contenant de la capsid. Pour les tests d'infectivité intracellulaire, les cellules infectées ont été lavées au PBS et lysées par incubation dans 1 mL d'eau pour produire un choc hypo-osmotique. Les débris ont été culottés par centrifugation et les lysats ont été utilisés sur des cellules Huh 7.5 naïves de façon identique au test d'infectivité extracellulaire.

H. Quantification de l'ARN viral (Commun aux trois projets)

Les cellules infectées ont été lysées et les ARNs intracellulaires isolés grâce au Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 200 ng d'ARN dans un volume total de 20 μ L comprenant des hexamères nucléotidiques aléatoires à l'aide du système Superscript™ III Platinum® one-step quantitative RT-PCR (Invitrogen). Une qPCR à quantification relative sur l'ARN a été effectuée à l'aide de deux paires d'amorces, la première amplifiant l'extrémité 5' NC de l'ARN viral (5' TCTGCGGAACCGGTGAGTA 3' / 5' TCAGGCAGTACCACAAGGC 3') et la seconde amplifiant le transcript de la β -actine (5' CGCACCCTGGCATTGTCAT 3' / 5' TTCTCCTTGATGTCACGCAC 3'). Les réactions ont été réalisées avec le système SYBR green I master (Roche Applied Sciences) dans l'appareil Roche LightCycler 480. Après normalisation des résultats par l'expression du transcrit de l'actine, l'expression de l'ARN viral de JFH-1 trois jours post-transfection a été arbitrairement fixée à la valeur 1, les différents résultats obtenus sont présentés en fonction de cette référence. Une seconde normalisation a ensuite été effectuée en fonction du pourcentage de cellules infectées.

L'ARN présent dans les surnageants infectieux a quant à lui été quantifié selon les techniques de routine hospitalière disponibles localement à l'aide du système Abbott RealTime HCV et l'appareil Abbot m2000_{sp}-m2000_{rt}.

I. Test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Lié au projet n°2)

Des plaques ELISA nunc maxisorp® ont été sensibilisées par 2µg d'anticorps de souris anti-FLAG (sigma) par puits, dilués dans 100µl de tampon bicarbonate (pH=9,4) par puits, avec une incubation de 4°C pendant une nuit. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec du tampon de lavage PBST (PBS 1X/ tween 20 0,5%) puis, les plaques ont été saturées par 300 µl/puits de tampon de saturation (tampon de lavage contenant 5% de lait écrémé) pendant 30 minutes à 37°C. Un nouveau lavage a été effectué 3 fois. 100µl/puits de lysats provenant des cellules BHK-21 transfectées traitées avec un tampon de lyse (0,8% de NP40, EDTA 1mM, Tris 1M [pH 8]) ont été déposés, dilués au 1/20e dans du tampon de saturation avec une incubation de 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages successifs, 100 µl d'anticorps primaires anti-HA de lapin (Sigma) dilués au 1/200e, ou anti-capside B12F8 dilués au 1/10e ou les sérums de patients dilués au 1/100e ont été déposés et incubés à température ambiante pendant une heure. Après lavage en PBST, 100µl/puits d'anticorps secondaires marqués à la peroxydase, anti-lapin (invitrogen) dilués au 1/2000e ou anti-humain (invitrogen) dilués au 1/5000e ont été incubés 1 heure à température ambiante. Après lavage, une solution de substrat, ortho-phenylenediamine dihydrochloride (o-PD) a été distribuée à 200 µl/puits. Les plaques ont été ensuite incubées pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité. La réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ 2N par puit puis la densité optique a été mesurée par lecture à 490 nm, en utilisant le lecteur de plaque Dynex Technologies Revelation 4.25 (Dynatech).

Résultats

Projet n°1 : Application de nouvelles techniques d'imagerie cellulaire à l'étude des mécanismes gouvernant la morphogenèse du virus de l'hépatite C

Objectifs des travaux de recherche

Depuis sa découverte en 1989, la connaissance de ce virus n'a cessé de progresser, en particulier ces dernières années avec la mise au point du modèle de propagation du virus *in vitro* basé sur le clone viral JFH-1 développé par le docteur Wakita (Wakita *et al.*, 2005). Ce clone de génotype 2a constitue actuellement le seul génome permettant une propagation complète du virus *in vitro*. De par ses propriétés particulières, l'utilisation de ce modèle ne reflète peut-être pas complètement et fidèlement l'infection naturelle par le VHC, mais en l'absence d'autres séquences de génomes de VHC capable de répliquer efficacement *in vitro*, ce système reste actuellement le modèle de référence permettant d'étudier toutes les phases du cycle viral et notamment l'assemblage de la particule virale, dont la localisation subcellulaire reste encore aujourd'hui une question largement débattue (Miyanari *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007).

Afin de pouvoir préciser la localisation du bourgeonnement, notre objectif a été d'élaborer un génome JFH-1 bicistronique, construit selon la même stratégie que les travaux de Wakita et coll. (Wakita *et al.*, 2005), mais permettant d'exprimer deux copies de la protéine de capside dont l'une sera taguée pour être observée en vidéo-microscopie. Les tags utilisés seront de type GFP et FlAsH/ReAsH (Invitrogen), ce dernier ayant la caractéristique d'être très court (12 résidus) et de pouvoir être rendu fluorescent en cellules vivantes offrant ainsi l'opportunité de visualiser des processus dynamiques. Le recours à un vecteur bicistronique ayant pour stratégie d'exprimer deux copies de la même protéine, bien que constituant une approche singulière, découle des travaux montrant que la protéine de capside, de séquence très conservée, supporte difficilement la délétion ou le remplacement de régions supérieures à quelques acides aminés sans perte majeure de ses propriétés dans le contexte du clone JFH-1. Ainsi, les propriétés d'assemblage des protéines taguées, probablement partiellement altérées, pourraient être restaurées par la présence d'une protéine de capside sauvage. Au préalable, les différentes protéines de capsides taguées réalisées seront exprimées dans le cadre du système d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV) afin de sélectionner celles conservant la plupart des propriétés de la protéine de capside sauvage, pouvant par la suite permettre d'envisager un co-assemblage des deux formes au sein des particules virales matures dans le système HCVCc.

III. Résultats

A. Elaboration de séquences de capsides taguées

Depuis plusieurs années, notre équipe s'intéresse à l'étude de la morphogénèse du VHC, en exprimant les protéines structurales du virus à l'aide de systèmes de surexpression, dérivés du virus de la forêt de Semliki (SFV) (Blanchard *et al.*, 2002; Hourieux *et al.*, 2007). Ces travaux ont notamment permis de montrer que la protéine de capside du VHC constituait l'élément moteur pour l'assemblage de pseudo particules virales à la membrane du RE (Blanchard *et al.*, 2003). Bien que l'utilisation du système SFV ne modélise pas le cycle viral complet du VHC, ce modèle présente cependant l'opportunité d'étudier en microscopie électronique les propriétés de la capside du VHC et l'effet de mutations ou de tags introduits dans la séquence de cette protéine dans les mécanismes de la morphogénèse virale.

Les précédents travaux de l'équipe ont également permis de cartographier la protéine de capside du VHC, en montrant l'implication de certains domaines dans la formation de pseudovirions dans le cadre d'une expression de la séquence de capside de génotype 1a « Dj » à l'aide du système SFV (Hourieux *et al.*, 2007). Compte tenu de ces informations, les tags (FlAsH/ReAsH, GFP) ont été insérés dans la séquence de la capside de façon à perturber le moins possible la création de ces pseudovirions. Bien que la séquence de la GFP soit relativement longue entraînant potentiellement de sérieuses modifications des propriétés de la protéine de capside, cette stratégie a cependant été envisagée en raison de la forte fluorescence de la GFP, ceci constituant un atout en cas de succès pour une détection aisée des phases de l'assemblage viral. Contrairement à la GFP, le tag FlAsH/ReAsH a la particularité d'être de courte longueur (12 résidus) et possède l'avantage de pouvoir être utilisé selon un mode pulse/chase en cellules vivantes. En outre il est peut aussi être exploité pour une observation en microscopie électronique. Cinq constructions de capsides modifiées (deux avec la GFP, trois avec la séquence FlAsH/ReAsH) ont donc été réalisées en deux versions : une permettant le clonage en vecteur SFV et la seconde permettant un clonage dans un génome JFH-1 bicistronique. Ces constructions de capsides ont été comparées aux protéines de capsides sauvages, comprenant celle du clone JFH-1 (C191-WK-WT) et celle utilisée dans nos

précédents travaux (Blanchard *et al.*, 2003), dénommée Dj (C191-Dj). Enfin, une construction exprimant la β -galactosidase (pSFV3) a été utilisée comme contrôle.

1) Séquences de capsides taguées à la GFP

Réalisées selon le modèle présenté en **Figure 23**, les deux constructions « GFP Del3 en Nterm » et « GFP Del3 en Cterm » possèdent une séquence de la GFP située respectivement en aval et amont du domaine Del3 (compris entre les aa 88 à 106), un site décrit précédemment comme essentiel à la formation de pseudovirions dans le cadre d'une expression en système SFV (Hourieux *et al.*, 2007). Après plusieurs PCR réalisées avec des amorces spécifiques et contrôle des séquences, celles-ci ont été clonées dans le vecteur d'expression pSFV1 ou au sein du génome JFH-1 bicistronique.

2) Séquences de capsides taguées au FlAsH/ReAsH

Les séquences « FlAsH/ReAsH en Del1 » et « FlAsH/ReAsH en Cterm » ont été réalisées en utilisant les mêmes protocoles techniques que ceux décrits pour les constructions avec la GFP. Etant donné la longueur du tag, la séquence de celui-ci a été directement incorporée dans la séquence des amorces. De par sa nature, une seule PCR a été nécessaire pour la réalisation de la construction « FlAsH/ReAsH Nterm », de plus, la localisation d'un tag à l'extrémité Nterminale de la séquence de la protéine de capside laisse celle-ci finalement inchangée (**Figure 23**). L'insertion du tag en lieu et place du domaine Del1 a été choisie sur la base de l'observation que cette région n'affectait pas la formation de pseudoparticules en système SFV (Hourieux *et al.*, 2007). Concernant la construction « FlAsH/ReAsH en Cterm », l'insertion du tag a été privilégiée en amont du domaine 3, mais en aval du domaine 2 de la protéine de capside afin de ne pas perturber son clivage par la SPP et de minimiser un impact négatif dans les mécanismes d'interaction avec les lipides cellulaires (membrane du RE et gouttelettes lipidiques) (Boulant, 2006; Ait-Goughoulte, 2006; McLauchlan, 2002).

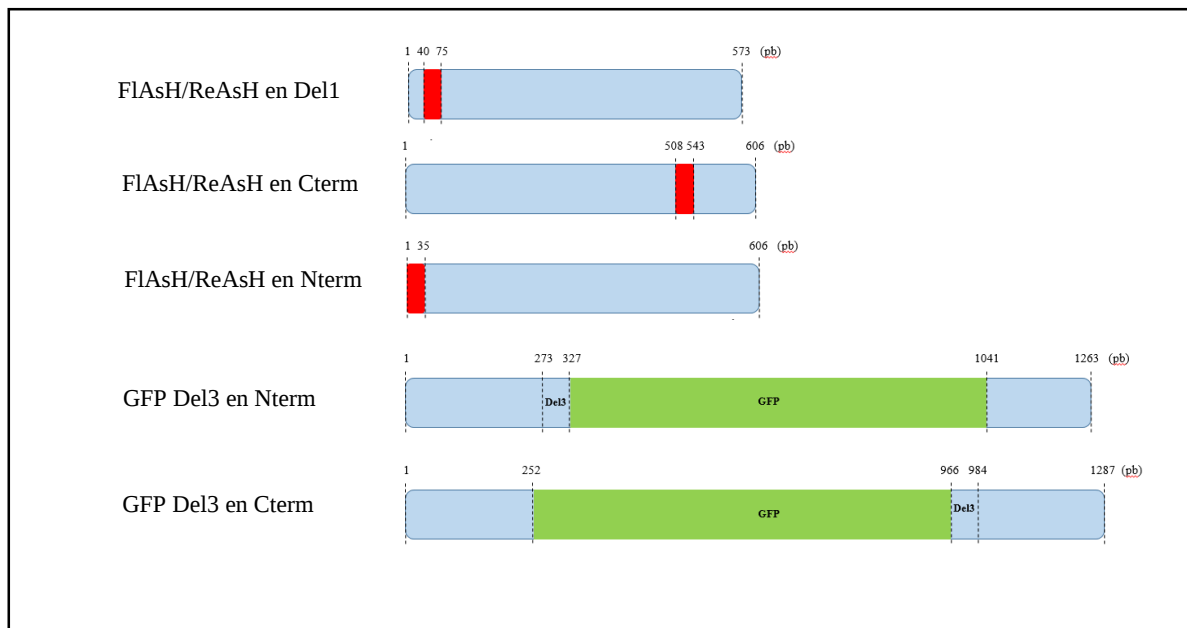


Figure 23. Représentation schématique des gènes de capsides taguées conçus

Les zones colorées en rouge représentent la séquence du tag FlAsH/ReAsH, les zones en vert celle de la GFP.

B. Etude de l'expression des séquences de capsides taguées dans le système SFV

Après transfection des vecteurs SFV codant les différentes protéines de capside modifiées en cellules BHK-21 ou FLC4, des analyses en immunofluorescence et microscopie électronique à transmission ont été effectuées afin d'évaluer l'impact de l'insertion des tags sur les propriétés de multimérisation et d'assemblage en VLPs de la protéine de capside.

1) Contrôle de l'expression protéique par immunocytochimie

16 heures après transfection des cellules BHK-21, des immunomarquages spécifiques de la protéine de capside ont été réalisés avec l'anticorps monoclonal C7-50 (Thermo) pour l'observation des constructions comportant le tag FlAsH/ReAsH. Une fluorescence cytoplasmique intense a révélé de hauts niveaux d'expression avec l'ensemble des constructions, le témoin SFV3, exprimant la β -galactosidase, n'a révélé aucune fluorescence démontrant ainsi la spécificité du marquage. Les résultats ont permis d'estimer à 80% en

moyenne le nombre de cellules transfectées exprimant les protéines de capsides (**Figure 24**). L'observation des cellules transfectées par les constructions « GFP Del3 en Nterm » et « GFP Del3 en Cterm » révélait une fluorescence sans utilisation de l'immunocytochimie, preuve de l'expression de la GFP (**Figure 24**).

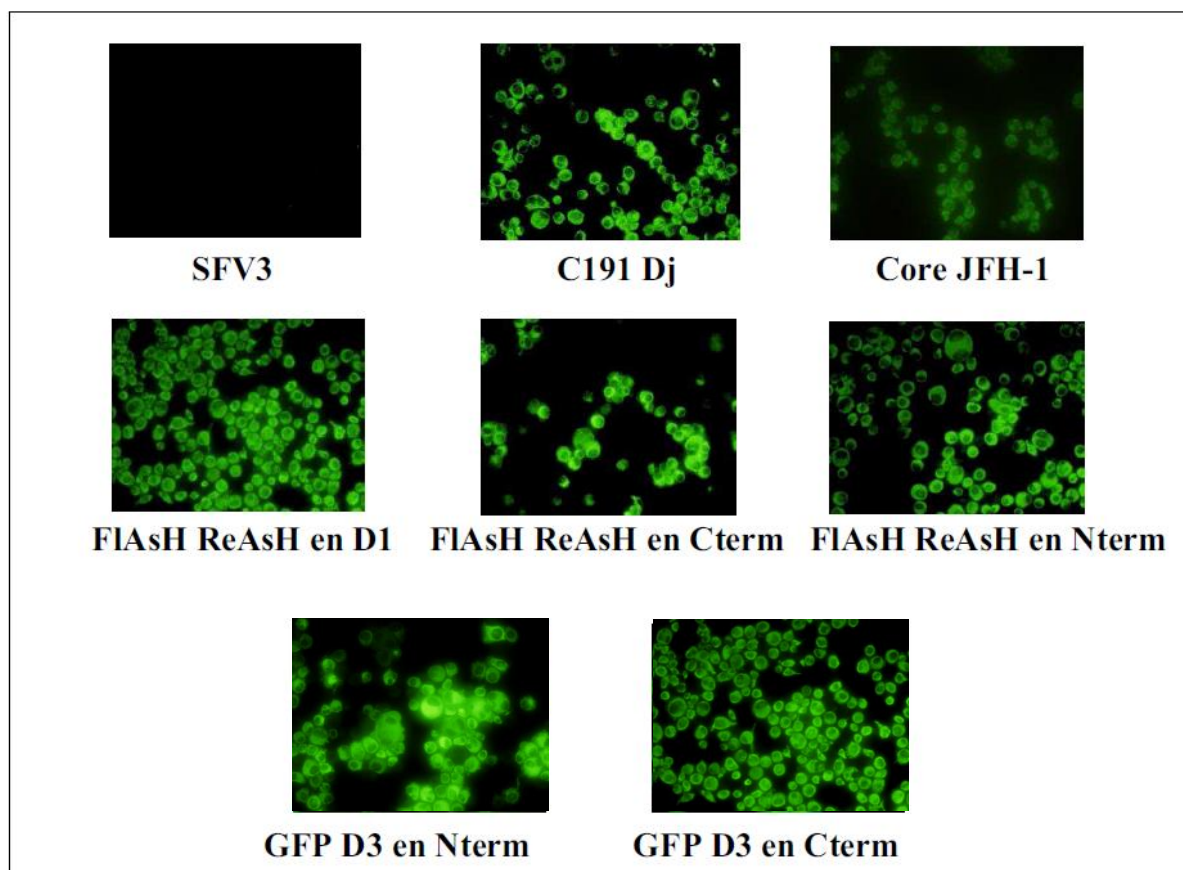


Figure 24. Analyse par immunofluorescence (et fluorescence de la GFP pour les constructions fusionnées à la GFP) de l'expression des différentes protéines de capside transfectées. Les protéines de capside sauvages et taguées sont détectées dans environ 70 à 80% des cellules électroporées excepté dans les cellules exprimant la β -galactosidase (ARN SFV3) utilisées ici comme contrôle négatif.

2) Colocalisation des protéines de capsides avec les gouttelettes lipidiques

Afin d'étudier plus finement la localisation subcellulaire de la protéine de capside, la lignée hépatocellulaire FLC4 a été privilégiée en raison de l'expression des protéines d'intérêt à un niveau moins élevé que les cellules BHK-21, se révélant ainsi mieux adaptée à l'observation en microscopie confocale. Globalement, une fluorescence verte cytoplasmique a été observée pour

tous les mutants de la protéine de capsid hormis dans les cellules exprimant la β -galactosidase (transfection SFV3), utilisées comme contrôle négatif. Le marquage par le Nile Red a permis l'observation des gouttelettes lipidiques qui émettent une fluorescence rouge (**Figure 25**). Dans les cellules transfectées par l'ARN SFV3 ces gouttelettes présentent une localisation diffuse dans tout le cytoplasme et, comme attendu (Barba *et al.*, 1997), une forte colocalisation a été observée entre la protéine de capsid et les gouttelettes lipidiques dans les cellules exprimant les formes sauvages de la protéine (C191 Dj et C191 JFH-1). Pour l'ensemble des constructions de capsides taguées, une relocalisation et un regroupement des gouttelettes en zone périnucléaire a également été observée, bien que la colocalisation avec la protéine de capsid soit pour certaines constructions difficile à mettre en évidence (Constructions « GFP Del3 en Cterm » et « FlAsH/ReAsH en Cterm »). Il semble également (à l'instar de ce que l'on observe dans les cellules exprimant les protéines de capsides sauvages) que l'expression de l'ensemble des protéines de capsides taguées conduise à l'observation de gouttelettes plus volumineuses que pour les cellules témoins. Il semble donc que l'insertion des tags, judicieusement choisie, n'ait que peu d'influence dans les capacités d'interaction de la protéine de capsid avec les lipides cellulaires, ce qui laisse présager d'un trafic de la protéine vers les gouttelettes lipidiques (événement clef pour les phases d'assemblage du virus (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007)) même s'il semble diminué pour certaines constructions.

3) Analyse de l'expression des constructions de capsid en microscopie électronique

Les cellules BHK-21 récupérées 16 heures après la transfection ont été fixées et des coupes ultrafines ont été réalisées en vue de les observer au microscope électronique à transmission. Comme cela était attendu, la présence de bourgeonnement de pseudovirions au niveau des membranes du RE associée à l'observation de nombreuses gouttelettes périnucléaires a été observée dans les cellules exprimant la protéine de capsid C191 Dj (**Figure 26A**). De façon tout à fait surprenante, la protéine de capsid sauvage du clone JFH-1 bien que retrouvée associée aux membranes du RE, avec la présence de membranes circonvolutées caractéristiques, n'a pas permis l'observation de bourgeonnement de pseudoparticules. Cette expérience répétée plusieurs fois de façon indépendante, suggère que cette protéine de capsid est déficiente pour l'assemblage de VLPs lorsqu'elle est exprimée en système SFV. L'analyse

de l'expression des protéines de capsid e taguées ont montré qu'elles présentaient toutes des capacités d'assemblage déficientes, avec l'absence de formation effective de pseudoparticules et parfois une altération de leur localisation subcellulaire, reflétant un impact négatif liées à la présence des tags (**Figure 26D à 26H**). L'observation des cellules transfectées avec le plasmide contrôle pSFV3 n'a montré aucune modification ultrastructurale spécifique, le RE présentant des formes lamellaires identiques à celle des cellules non transfectées (**Figure 26C**). Seules les constructions exprimant les protéines de capsid e « FlAsH/ReAsH Nterm » et « FlAsH/ReAsH en Del1 » ont permis d'observer des membranes de RE circonvolutées caractéristiques, suggérant que seuls ces deux mutants présentaient des propriétés conservées d'association avec les membranes (**Figure 26D, F**). Pour la construction « FlAsH/ReAsH en Cterm », la protéine de capsid e semblait retrouvée sous formes d'amas denses et très localisés (flèches bleues, **Figure 26E**) à la fois à proximité du RE et plus rarement en surface des gouttelettes lipidiques. L'analyse des constructions de capsid e comportant la séquence de la GFP se sont révélées difficiles à interpréter, en l'absence de l'observation de modifications cellulaires caractéristiques à leur expression (**Figure 26G et H**). Afin de préciser la localisation subcellulaire des différentes protéines de capsid e étudiées, des immunomarquages en microscopie électronique (immunogold) ont par la suite été réalisées sur coupes ultrafines. Ceci a permis de constater la présence de la protéine à la fois en surface des gouttelettes lipidiques et au niveau de la membrane du RE pour les constructions exprimant la protéine de capsid e de Dj, JFH-1, FlAsH/ReAsH en Del1 et FlAsH/ReAsH Nterm (**Figure 27A, B, D, F**). En revanche, pour les constructions FlAsH/ReAsH Cterm et GFP D3 en Nterm, les immunomarquages ont révélé une profonde altération de la localisation subcellulaire de la protéine de capsid e, celle-ci n'étant plus détectée ni en surface des gouttelettes lipidiques ou à proximité du RE, mais étant présente sous formes d'amas cytoplasmiques plus ou moins étendus et non structurés (**Figure 27E, G**). La localisation cellulaire pour la protéine exprimée par la construction « GFP Del3 en Cterm » n'a pu être clairement déterminée malgré la réalisation répétée de techniques d'immunomicroscopie, il semblerait donc que la présence de la GFP soit de nature à diminuer la capacité de reconnaissance de la protéine de capsid e par l'anticorps C7-50. Globalement, nos résultats montrent que la présence du tag FlAsH/ReAsH en position C-terminale perturbe fortement la structure et la localisation de la protéine de capsid e, et tend à augmenter ses capacités d'agréations en structures denses. Toutefois, à l'inverse, il semble que l'insertion d'un petit tag tel FlAsH/ReAsH dans la partie N-terminale de la protéine ne modifie pas significativement les capacités d'adressage de la protéine de capsid e au RE ou sa liaison avec

les gouttelettes lipidiques. Enfin, comme cela était attendu, dans les constructions de capsides fusionnées avec la GFP, cette dernière induit des modifications majeures de la protéine de capsides, qui semblent à priori rédhibitoires pour une exploitation future en VHCcc.

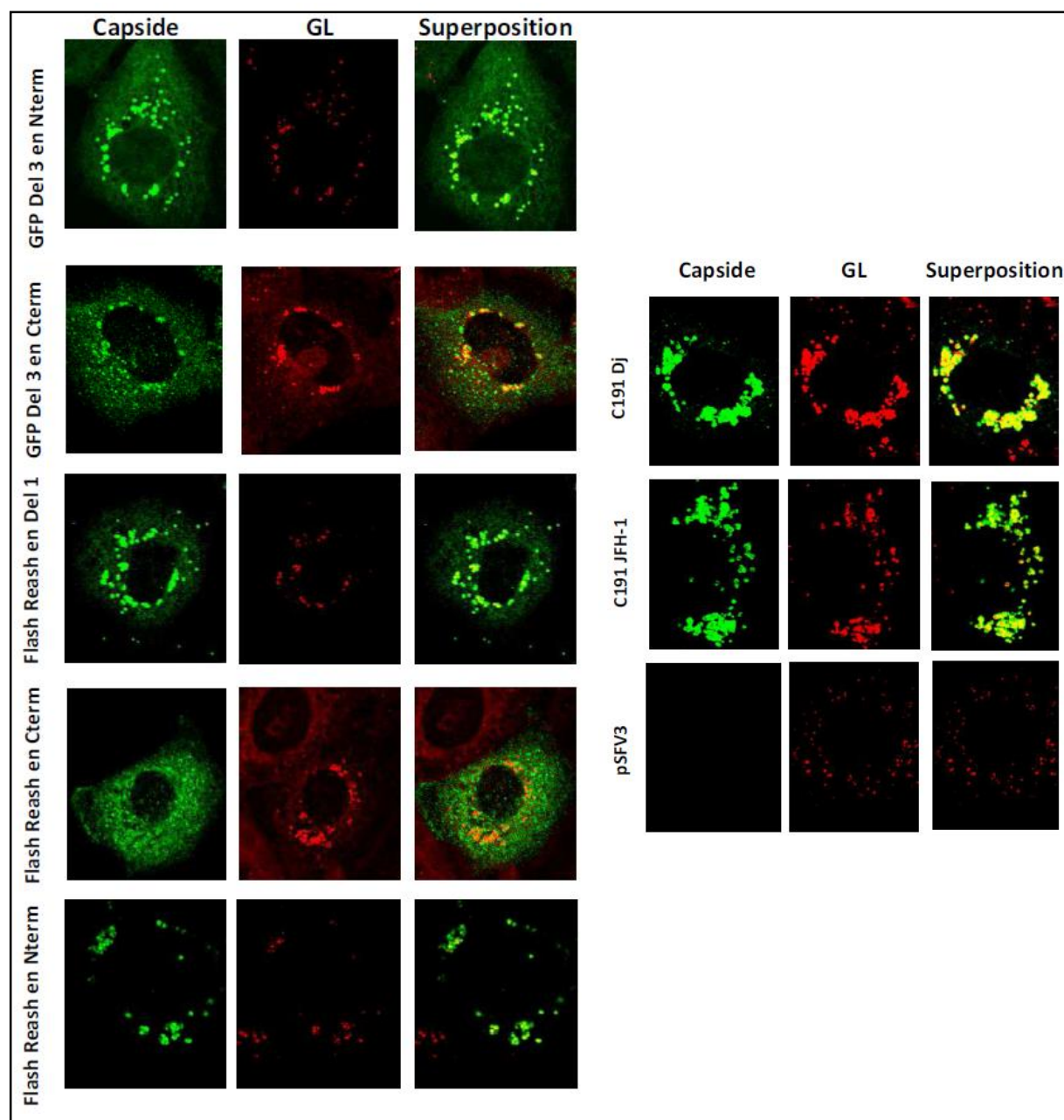
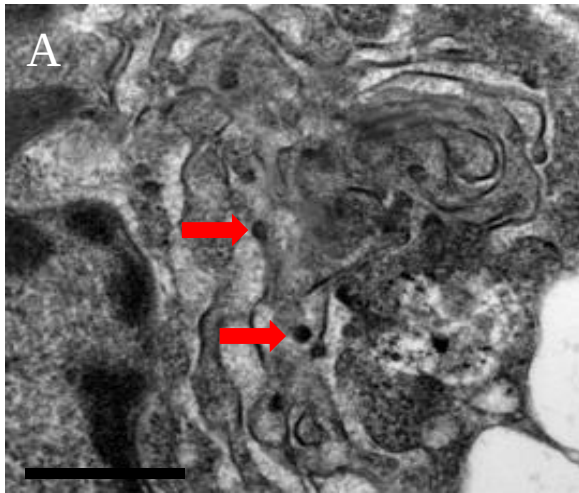
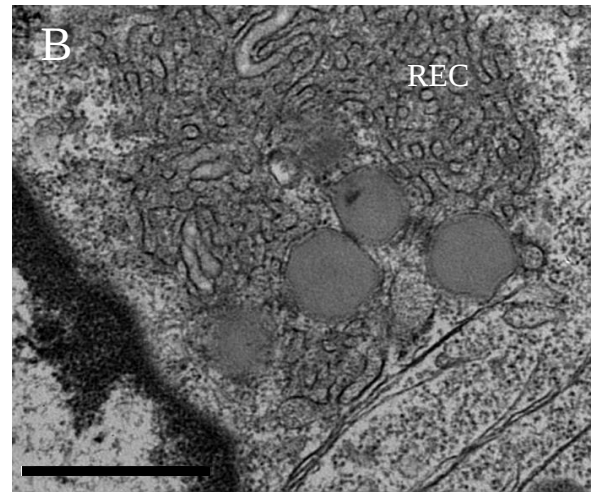


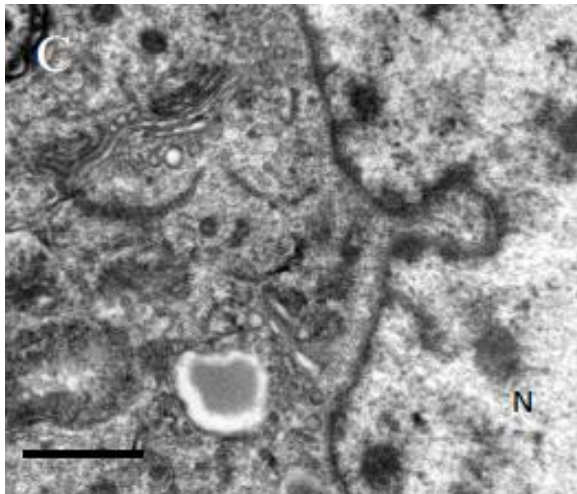
Figure 25: Analyse en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des différentes protéines de capsides et de la répartition des gouttelettes lipidiques (GL) dans les cellules FLC4. La protéine de capsides a été immunomarkée à l'aide de l'anticorps monoclonal C7-50, les GL sont révélées à l'aide du Nile Red. Les protéines de capsides sauvages ainsi que les protéines « FlAsH/ReAsH en Del1 » et « FlAsH/ReAsH en Nterm » colocalisent avec les gouttelettes lipidiques.



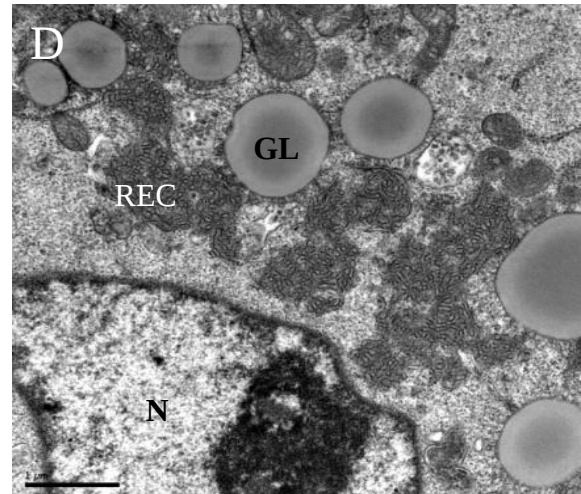
C191 Dj



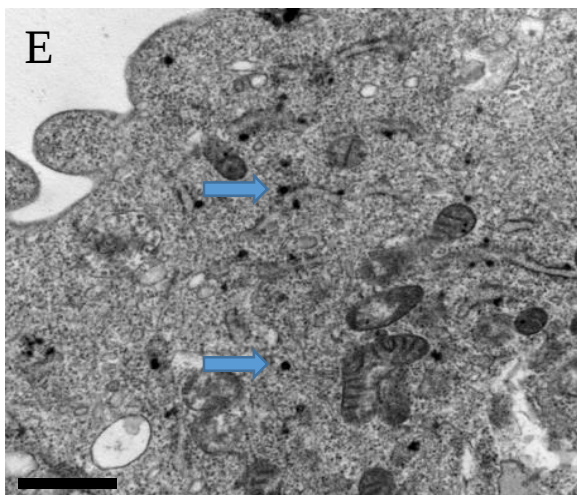
C191 JFH-1



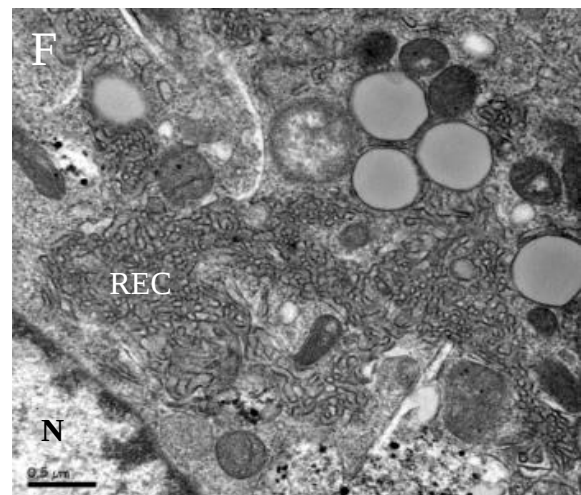
SFV3



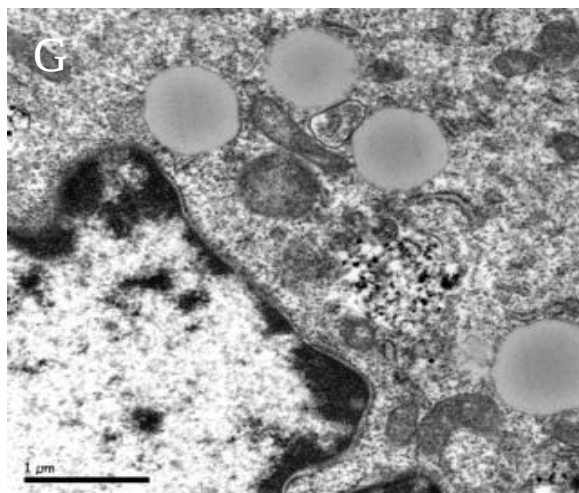
FIAsH/ReAsH en Del 1



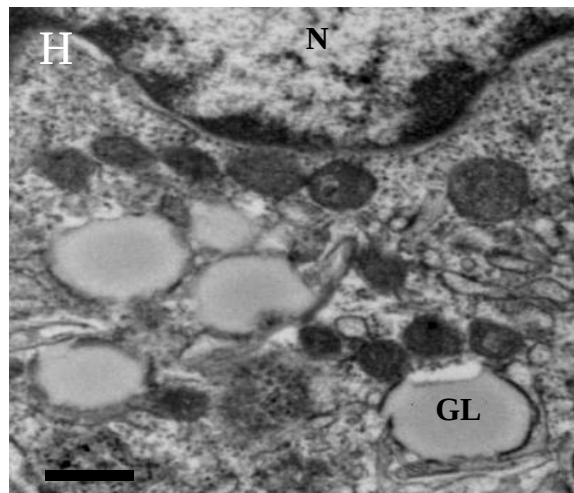
FIAsH/ReAsH en Cterm



FIAsH/ReAsH en Nterm



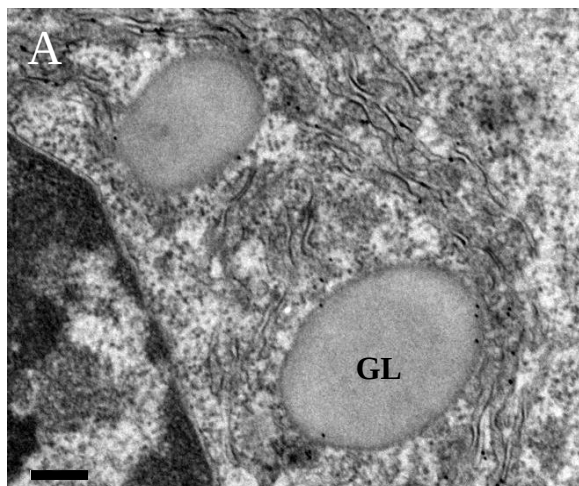
GFP Del 3 en Cterm



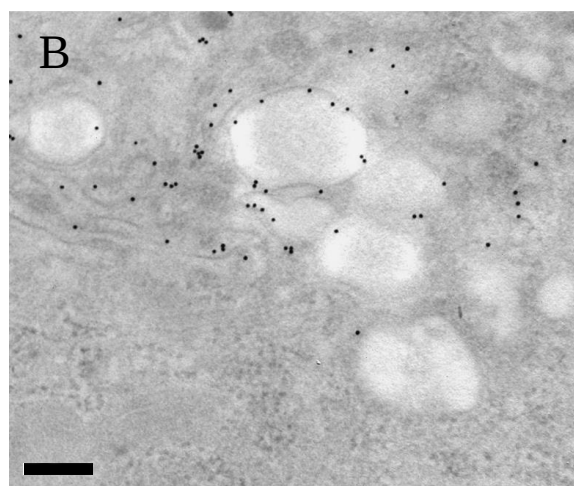
GFP Del 3 en Nterm

Figure 26. Micrographies électroniques de sections ultrafines de BHK-21 transfectées avec les différentes séquences de capsides modifiées

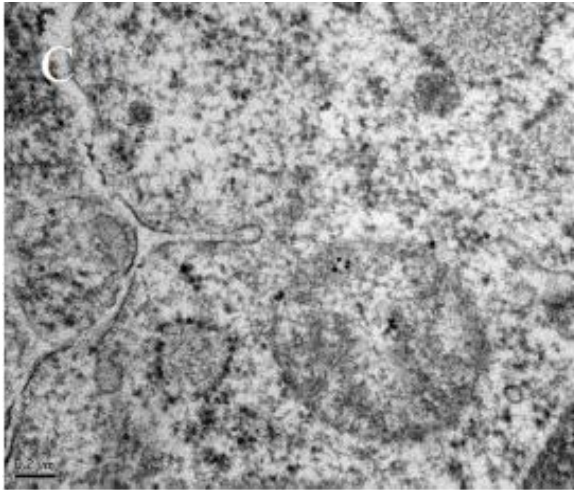
Le réticulum endoplasmique circonvoluté, dense aux électrons, n'est visible qu'avec les témoins positifs C191-DJ et C191-JFH-1 ainsi qu'avec les constructions « FlAsH/ReAsH en Del1 » et « FlAsH/ReAsH en Nterm ». La construction C191-DJ est la seule à présenter des bourgeonnements de pseudoparticules à partir des membranes du RE (Flèches rouges). Les protéines de capside « FlAsH/ReAsH en Cterm » semble s'agréger en amas denses aux électrons (Flèches bleues) GL : gouttelette lipidique ; N : Noyau ; REC : RE circonvoluté. Barres d'échelle : 1µm pour toutes les constructions, excepté "FlAsH/ReAsH Nterm" : 0,5 µm



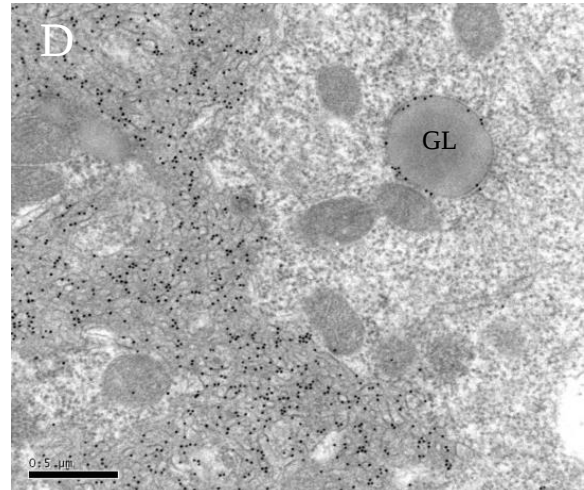
C191 Dj



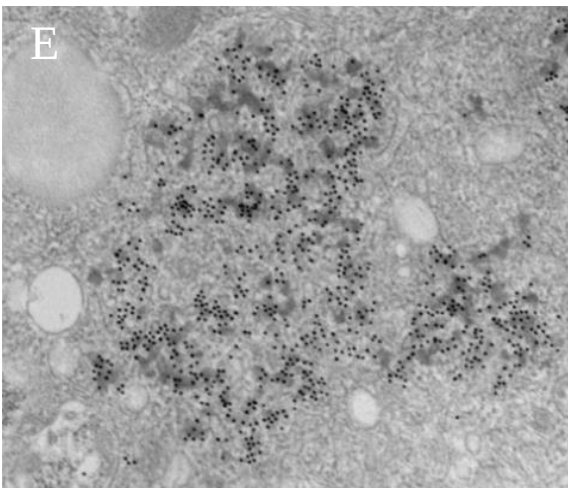
C191 JFH-1



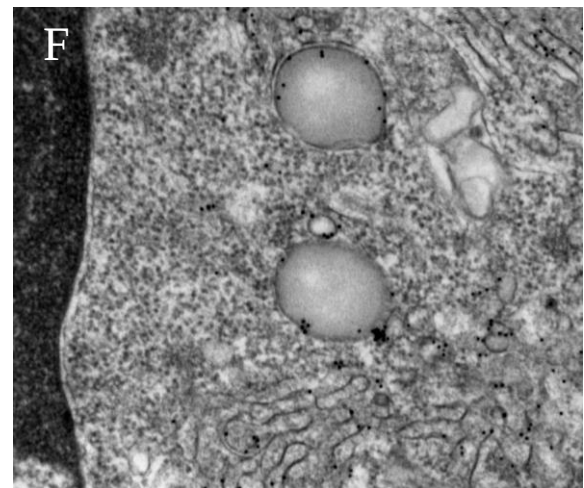
SFV3



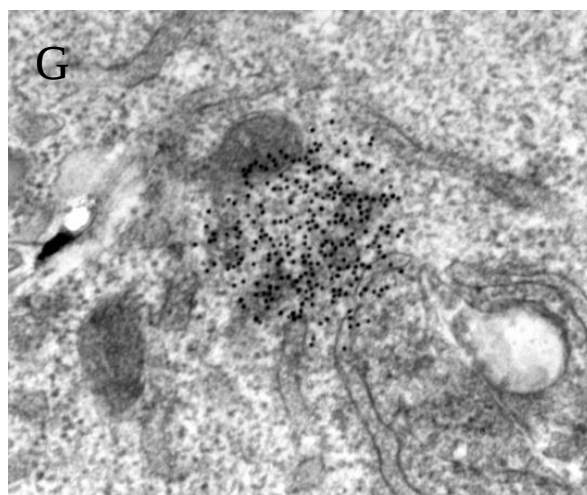
FIAsH/ReAsH en Del 1



FIAsH/ReAsH en Cterm



FIAsH/ReAsH en Nterm



GFP Del 3 en Nterm

Figure 27: Immunomarquage en microscopie électronique de la protéine de capsid du VHC

La présence de billes d'or retrouvées au niveau du RE circonvoluté et des gouttelettes lipidiques pour les constructions C191 DJ, C191 JFH-1, « FIAsh/ReAsH en Del1 » et « FIAsh/ReAsH en Nterm » montre que malgré la présence du tag, la protéine de capsid a conservé ses propriétés d'adressage au RE et d'association aux gouttelettes lipidiques. Concernant les constructions « GFP Del3 en Nterm » et « FIAsh/ReAsH en Cterm » des billes d'or sont visibles en amas dans le cytosol et rarement présentes à la surface des gouttelettes lipidiques, montrant une altération de la localisation subcellulaire de la protéine liée à la présence du Tag. Malgré plusieurs tentatives, l'immunomarquage de la capsid « GFP Del3 en Cterm » s'est avéré impossible. Aucune bille d'or n'est observée avec le contrôle négatif SFV3, ce qui démontre la spécificité de l'immunomarquage. Barres d'échelle : 1 µm pour « FIAsh/ReAsH en Del1 » et « FIAsh/ReAsH Nterm », 0,2 µm pour les autres micrographies.

C. Elaboration d'un génome JFH-1 bicistronique

La mise au point du génome JFH-1 bicistronique, basée sur la stratégie utilisée pour élaborer des génomes JFH-1 codant la luciférase (Wakita *et al.*, 2005), a consisté à insérer un IRES (IRES ECMV, issu du virus de l'encéphalomyocardite) ainsi qu'une séquence codant une deuxième protéine de capsid (**Figure 28**). Cette deuxième séquence de capsid complètement indépendante de la séquence et de la structure de l'IRES du VHC et « intégrée » à la polyprotéine du VHC est celle exploitée pour l'insertion de tags précédemment décrits. Le choix d'une telle stratégie a été guidé par plusieurs considérations : 1° la présence de la fin de l'IRES du VHC dans la séquence codant la capsid virale empêchant toute mutagenèse dans la partie Nterminale de la protéine 2° la mutagenèse même limitée de la séquence de la protéine de capsid abolisse dans la majeure partie des cas tout assemblage et sécrétion des particules virales (Murray *et al.*, 2007).

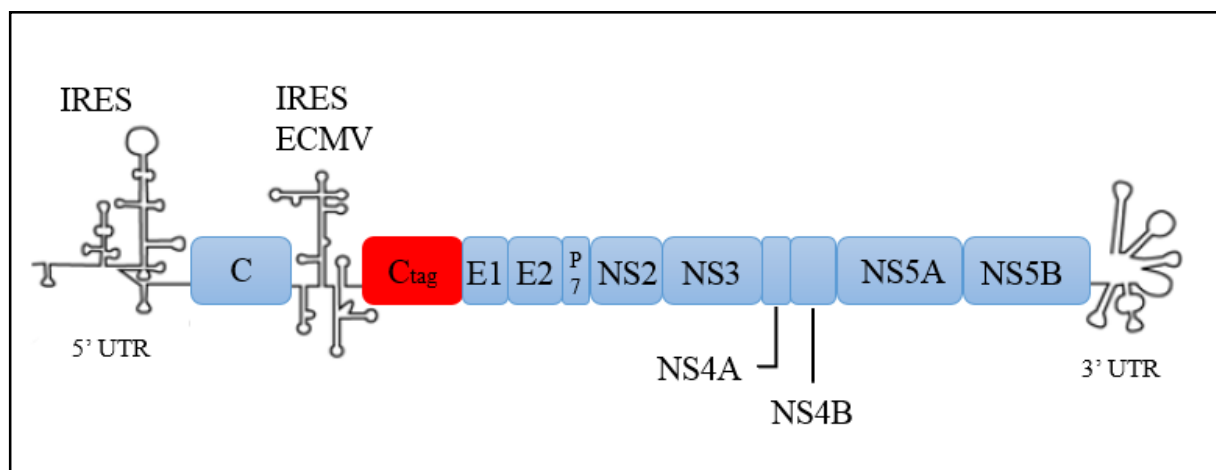


Figure 28. Schéma du génome JFH-1 bicistronique généré pour l'étude

La construction est composée en 5' de l'IRES du VHC suivi par la séquence de la protéine de capsid. A sa suite a été inséré l'IRES de l'ECMV ainsi que le cadre de lecture de la polyprotéine du VHC. La séquence de protéine de capsid située en aval de l'IRES ECMV a été choisie pour être remplacée par une séquence de capsid taguée (« Ctag » en rouge sur le schéma).

D. Expression du génome JFH-1 bicistronique en cellules Huh 7.5

Une fois synthétisé, le plasmide JFH-1 bicistronique possédant deux capsides sauvages a été transcrit *in vitro*, et les ARNs transfectés en cellules Huh 7.5 dans le but de tester la viabilité de la construction. Malheureusement, ce génome bicistronique s'avéra incapable d'initier une réplication significativement détectable (ARN, immunodétection des protéines). Bien que la stratégie de construction de ce génome bicistronique ait été vérifiée, en particulier en étudiant précisément les séquences publiées des génomes luciférase, les raisons de cet échec restent encore mal connues. Le projet a ainsi été abandonné après plusieurs tentatives d'expression sur cellules Huh 7.5. Toutefois, cette approche visant à étudier la protéine de capside à l'aide de tags FLAsH/ReAsH a par la suite été mise en application pour étudier dynamiquement le trafic de la protéine de capside en système HCVcc (Counihan *et al.*, 2011). Dans ce travail, c'est finalement un génome de VHC très peu modifié qui a été développé, le tag FLAsH/ReAsH ayant été placé au début de la séquence de la protéine de capside, sans recours à des stratégies compliquées à l'instar de celle que nous souhaitons développer. Une autre raison qui a aussi conduit à l'abandon du projet, était liée à l'observation, dans des expériences préliminaires, de marquages de protéines taguées par FLAsH/ReAsH montrant que le réactif arseniqué pour révéler la protéine de capside avait une affinité non négligeable pour marquer de façon non spécifiques les gouttelettes lipidiques cellulaires. Ceci peut s'expliquer probablement par la présence de cycles carbonés présents dans la structure de ce réactif, expliquant ses propriétés lipophyles. Cependant, nous n'avons réalisé que quelques expériences initiales, ce qui soulève la nécessité d'adapter très précisément les conditions techniques liées à l'utilisation de cette approche de marquage tétra-cystéine, comme cela a très probablement été le cas dans le travail publié par Counihan et coll.

**Projet n°2 : Etude de protéines potentiellement codées par
l'ARN négatif du virus de l'hépatite C**

Objectifs des travaux de recherche

Avec 600 000 personnes chroniquement infectées en France, le risque de voir augmenter le nombre de cirrhose et cancer du foie dans les prochaines décennies est élevé. De plus, les mécanismes de développement et de l'évolution de cette pathologie sont mal connus. Les études publiées à ce jour ont donné lieu à l'identification de multiples voies cellulaires dérégulées au cours de l'infection par le VHC, dont l'implication dans la cancérogénèse reste souvent à démontrer. Concernant le virus lui-même, il est complexe de comprendre son implication réelle dans l'hépatocarcinogénèse. Ceci tient notamment au fait que le VHC est un virus à ARN, ce qui rend son cycle indépendant d'une intégration dans le génome de la cellule, comme on peut l'observer pour d'autres virus comme certains rétrovirus, ou le virus de l'hépatite B.

Dans le cadre de ce projet, nous avons cherché à développer une approche autour de l'étude du brin négatif de l'ARN du VHC. Constituant un intermédiaire de réplication au cours de la réplication, il n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude précise, son rôle étant considéré comme strictement limité à fournir une matrice pour la recopie du génome du VHC.

Pour cela, nous avons collecté l'ensemble des séquences complètes du génome du VHC disponibles sur la base de données de Los Alamos. Les premières analyses montrent que plusieurs cadres ouverts de lecture (ORFs) sont présents sur l'ARN négatif du VHC. De façon tout à fait remarquable, on constate que certains de ces ORFs sont hautement conservés. Ceci suggère que ces ORFs pourraient être essentiels au cycle du virus en étant traduits sous forme de nouvelles protéines virales non identifiées à ce jour. L'objectif de ce projet sera donc de rechercher la présence potentielle de ces protéines dans le sérum de patients infectés et de s'intéresser à leurs rôles dans le cycle viral et plus particulièrement de déterminer leur implication dans les aspects de la pathogénèse virale, qui pourraient être associés à la survenue à long terme de la cirrhose et de l'hépatocarcinome.

Parallèlement, une étude a été effectuée sur l'ARN négatif du génome JFH-1. Isolé à partir du sérum d'un patient atteint d'une hépatite fulminante, ses propriétés de réplication *in vitro* uniques n'ont toujours pas été clairement expliquées. Nous avons donc souhaité déterminer si ces propriétés remarquables n'étaient pas sous l'action de protéines particulières potentiellement produites grâce à son ARN négatif.

A. Analyse bio-informatique des ORFs présents dans l'ARN (-) du VHC

Pour cette étude, nous avons tout d'abord collecté l'ensemble des séquences complètes de VHC (ARN viral positif) disponibles dans la base de données de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov/content/index>) en nous focalisant plus particulièrement sur les séquences de génotypes 1 et 2. En effet, le génotype 1 a retenu notre attention du fait du nombre important de séquences disponibles dans la base de données et de par sa prédominance dans les infections VHC en Europe. Les analyses effectuées en génotype 2 ont notamment été réalisées pour être comparées aux caractéristiques de la souche JFH-1 (Génotype 2a). En effet, Le clone JFH-1 possède probablement des propriétés particulières (non identifiées à ce jour), qui permettent à cet unique clone de se répliquer *in vitro*.

1) Analyse des ORFs du génotype 1

Le site de base de données de séquences du VHC de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov>) a permis la récupération de toutes les séquences complètes de VHC dont 1014 séquences de génotype 1 et 53 de génotype 2. Ces séquences ont été importées et étudiées dans le logiciel de base de données Filemaker pro 12 en élaborant des scripts "maison". Chaque séquence a ainsi été convertie en ARN négatif puis des algorithmes ont été développés pour réaliser un screening de ces séquences à la recherche d'ORFs potentiellement présents avec un seuil inférieur fixé à 270 nucléotides minimum. Ensuite, les ORFs recensés ont été convertis en séquences protéiques puis exportés en fichier Fasta et analysés par les logiciels d'alignement ebiox (<http://www.ebioinformatics.org/ebiox/>) et seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>) utilisant l'algorithme Clustalw.

De façon surprenante, les premières analyses ont permis de constater que la présence d'ORFs était retrouvée de façon restrictive dans certaines régions limitées de l'ARN négatif du VHC. De plus, la réalisation d'alignements de séquences de même génotype (943 séquences de génotype 1) montre une localisation conservée de ces ORFs (dans la même phase de lecture) tout au long de l'ARN négatif (**Figure 29**, restreint à la représentation de 50 séquences). Par la suite, la fréquence des ORFs potentiels a été quantifiée dans l'ensemble de la population des séquences d'ARN négatif de génotypes 1. La **figure 30**, présentant la fréquence de présence

d'un ORF le long de l'ARN négatif, montre que ces ORFs potentiels sont retrouvés avec des fréquences variables. Cependant, même si leur longueur varie, certains ORFs sont présents de façon tout à fait remarquable dans plus de 90% des séquences d'ARNs négatifs analysées (Astérisque, c).

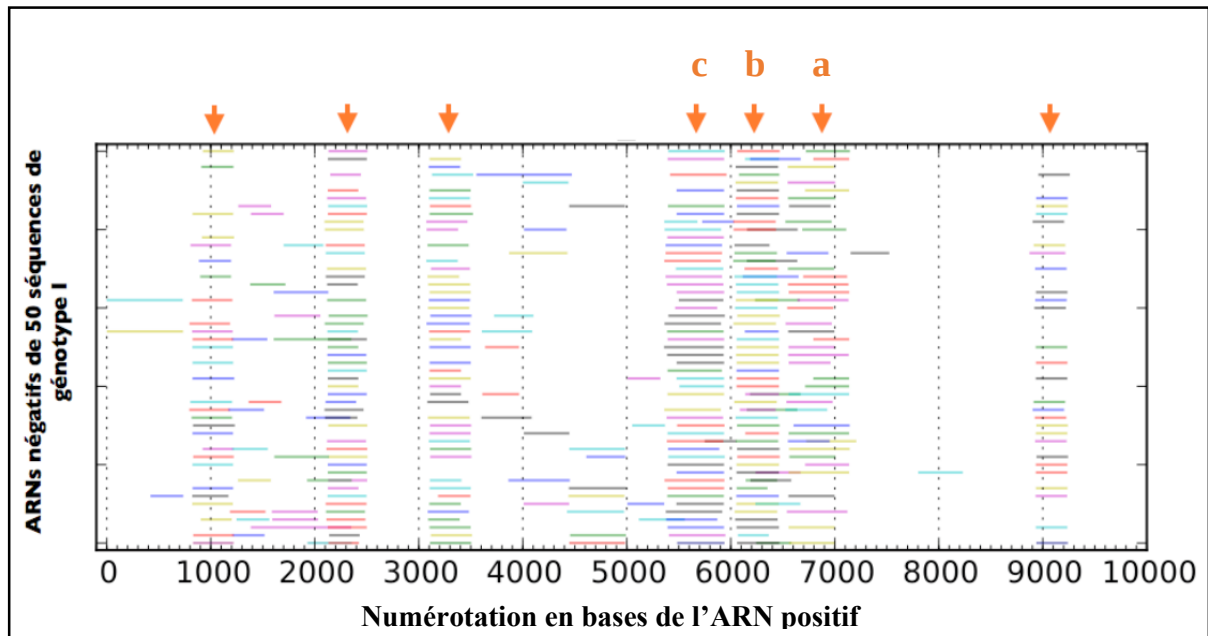


Figure 29. Graphique de synthèse restreint à la représentation de 50 séquences de l'ARN négatif issu de génotype 1. La présence d'ORFs est représentée sous la forme de traits de couleur aléatoire et de longueur proportionnelle à l'ORF détectée. Les flèches orange montrent la conservation de la localisation d'une majorité de ces ORFs.

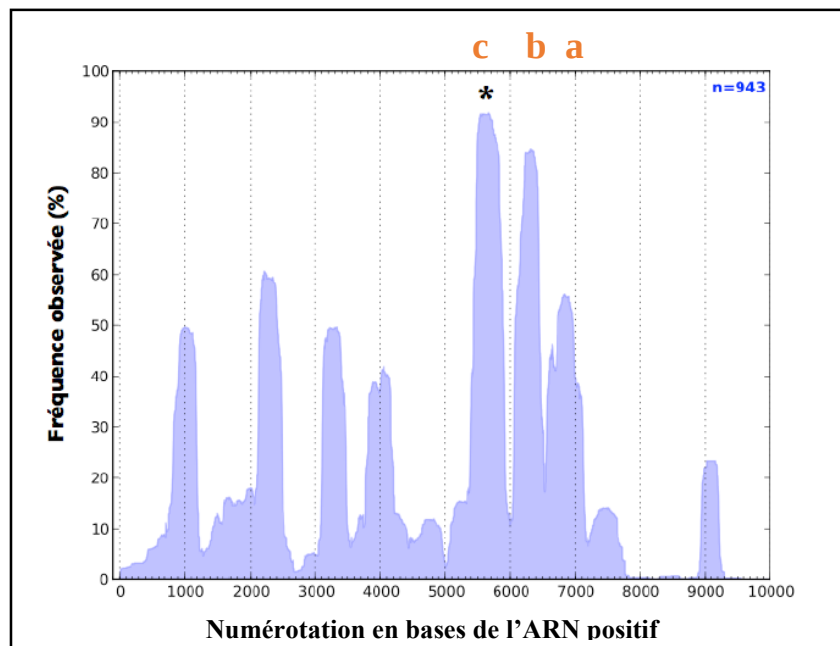


Figure 30. Représentation graphique de la fréquence (%) de présence d'ORFs analysée sur 943 séquences d'ARNs négatifs de génotype 1. Le «pic» signalé d'un astérisque correspond à un ORF présent dans plus de 90 % des séquences analysées.

Enfin, parmi ces séquences les plus conservées, trois (**Figure 29 et 30: a-b-c**) ont été traduites, les séquences protéiques ainsi obtenues ont été exportées en fichier Fasta puis analysées dans des logiciels d'alignement tel EbioX (<http://cbioinformatics.org/ebiox/>) et Seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>).

Après analyse *in silico* région par région, 2 régions ont retenu notre attention :

- La région « b » où un groupe majoritaire de plus de 900 séquences de tout génotype 1 confondu possède ce cadre de lecture ouvert nommé ORFb dans la même phase de lecture. Après traduction en séquences protéiques, la réalisation d'alignements de ces séquences montre des homologies intra-sous génotypique conservées à 90% (**Figure 31A**). Après détermination de séquences consensus, la conservation entre génotypes 1a et 1b montre une homologie inter-sous génotypique d'environ 75%.
- La région « c » présente les mêmes caractéristiques que l'ORFb : les séquences protéiques de génotypes 1a et 1b issues de cet ORFc, avec des homologies intra et inter génotypiques de 90% et 75 % respectivement (**Figure 31B**).

Concernant les autres régions visibles sur les **figures 29 et 30**, les ORFs se sont révélés peu conservés, avec des phases de lecture différentes entre sous-génotypes.

2) Analyse *in silico* du clone JFH-1 et des séquences de génotype 2

La souche JFH-1 a la particularité d'être la seule souche sauvage capable d'effectuer le cycle infectieux entier *in vitro*, une caractéristique probablement liée aux propriétés particulières de ses protéines non structurales. Nous avons donc étudié les ORFs présents sur son ARN négatif, principalement dans les régions de l'ARN négatif en regard de celles codant les protéines non structurales, constituant les régions communes non interchangeable entre les diverses séquences comprenant le clone JFH-1 et ses dérivés sous la formes de génomes chimères.

L'ARN (-) de JFH-1 a donc été analysé *in silico* de manière individuelle et 3 ORFs principaux ont retenu notre attention : l'ORF1 en regard du début de la séquence de NS5A et de la fin de NS4B, l'ORF2 en regard des protéines NS4B, NS4A et la partie C-terminale de NS3, et enfin l'ORF3 en regard du début de la séquence de NS3 (**Figure 32**). L'ORF2 a tout particulièrement retenu notre attention pour sa taille relativement grande. En effet, bien que l'on retrouve des homologues de cet ORF2 dans d'autres séquences de VHC, seul le clone JFH-1 est susceptible de coder une protéine de 312 aa pour cet ORF. Cela représente une caractéristique unique en comparaison des protéines homologues identifiées dans les autres génotypes et dont longueur ne dépasse pas 200 aa.

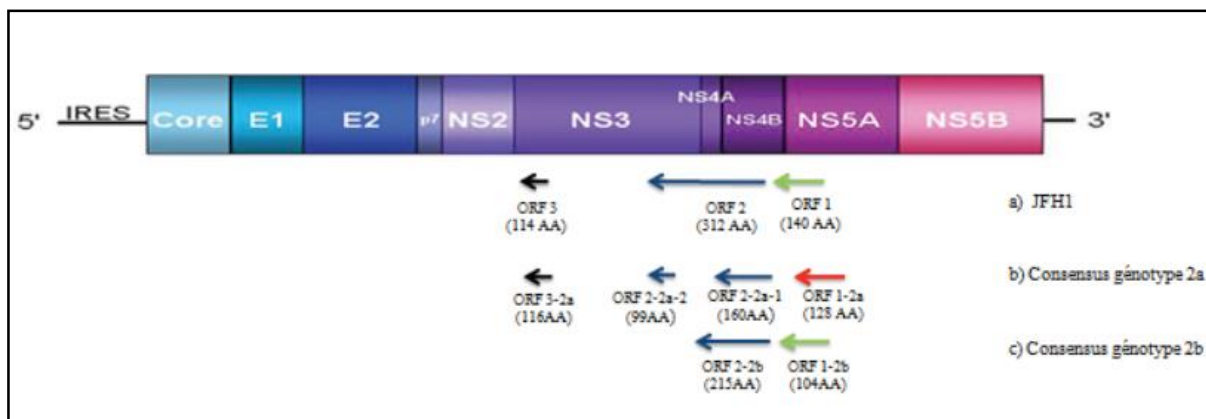


Figure 32. Analyse des différentes ORFs, détectés et codés potentiellement par l'ARN (-) de JFH-1.

Le génome du VHC est représenté avec ses extrémités 5' et 3' NC encadrant le cadre ouvert de lecture codant la polyprotéine virale. Les flèches représentent l'emplacement des ORFs identifiés sur l'ARN négatif du clone JFH-1 et sur les séquences consensus correspondantes des génotypes 2a et 2b. La couleur des flèches correspondent aux phases de lecture communes des différents ORFs.

Les ORFs identifiés dans le clone JFH-1 ont été comparés aux ORFs identifiés dans les 19 séquences complètes de génotype 2a et 25 séquences complètes de génotype 2b disponibles. Lorsque des ORFs conservés étaient présents (même cadre de lecture, même localisation sur l'ARN négatif, conservation supérieure à 80%), les séquences protéiques obtenues par traduction *in silico* ont été comparées en réalisant des alignements représentés graphiquement sur la **figure 33**.

4 ORFs (notés ORF1-2a ; ORF2-2a-1; ORF2-2a-2; ORF3-2a) ont ainsi été identifiés dans les séquences de génotypes 2a. L'ORF1-2a, bien que conservé à 95% et présent dans 15 séquences sur 19, ne possède pas la même phase de lecture que l'ORF1 présente au même endroit dans la séquence du clone JFH-1. Les trois autres ORFs possèdent des séquences homologues aux ORFs 2 et 3 de JFH-1 (même phase de lecture). Cependant, on remarque la présence de deux ORFs (ORF2-2a-1 et ORF2-2a-2) dans les 19 séquences de génotypes 2a répertoriées, couvrant la région de l'ORF2 de JFH-1 (en raison de codons stop présent dans cette région pour les séquences de génotype 2a) (**Figure 32**). Pour les génotypes 2b, 2 cadres de lecture ouverts conservés (ORF1-2b ; ORF2-2b) ont été retrouvés dans la plupart des séquences de génotypes 2b et possédaient la même phase de lecture que leurs homologues dans le clone JFH-1. L'un de ces ORFs, l'ORF2-2b (environ 215 aa) est comparable à celui détecté dans les séquences de génotype 2a (**Figure 33A**) et couvre partiellement l'ORF2 du clone JFH-1. Curieusement, l'ORF1 n'a pas été identifié dans les séquences de génotype 2a malgré sa présence dans le clone JFH-1 pourtant de génotype 2a. De façon étonnante cet ORF1 possède par contre une séquence homologue dans les séquences de génotype 2b (ORF1-2b, **Figure 32**). Cette première caractéristique, bien que difficile d'interprétation souligne probablement la particularité du clone JFH-1, représentant la seule séquence de génotype 2a à posséder un ORF sur le brin négatif en phase avec les séquences de génotype 2b.

Globalement, le résultat de ces analyses montre que seul l'ORF2 est partiellement conservé au sein des séquences de génotypes 2a et 2b. Dans cette région, 19 séquences de génotype 2a et 22 séquences de génotype 2b possèdent ce cadre de lecture ouvert ; dont les séquences traduites en protéines sont conservées à plus de 90 % au sein de chaque sous-type et 75% entre les 2 génotypes. La déduction de séquences protéiques consensus pour cet ORF à partir des alignements réalisés pour les génotypes 2a et 2b, et la réalisation d'alignements avec l'ORF2

ont permis de constater une conservation générale de ces séquences à hauteur de 75 % pour les parties communes.

Il est cependant étonnant de constater que seul le clone JFH-1 recèle un ORF2 particulièrement long (312aa). En analysant les autres séquences de génotype 2a, on constate que la taille importante de l'ORF2 dans JFH-1 s'explique par la disparition de 2 à 5 codons stop.

Les ORF « b » et « c » identifiés dans les séquences de génotype 1 (**Figure 31**) ont été comparés à l'ORF2 présent dans le clone JFH-1. L'étude a montré que seule l'ORF « c » était en phase avec l'ORF2 de JFH-1. La comparaison des séquences protéiques de l'ORF2 et de cet ORF « c » a permis de constater qu'elles présentaient des homologies élevées.

A la vue de ces résultats, l'objectif a été d'exprimer l'ORF2 et l'ORF « c » dans le but d'utiliser les protéines produites dans un test ELISA pour la recherche d'anticorps présents dans le sérum de patients atteints ou non de l'hépatite C et dirigés contre ces protéines.

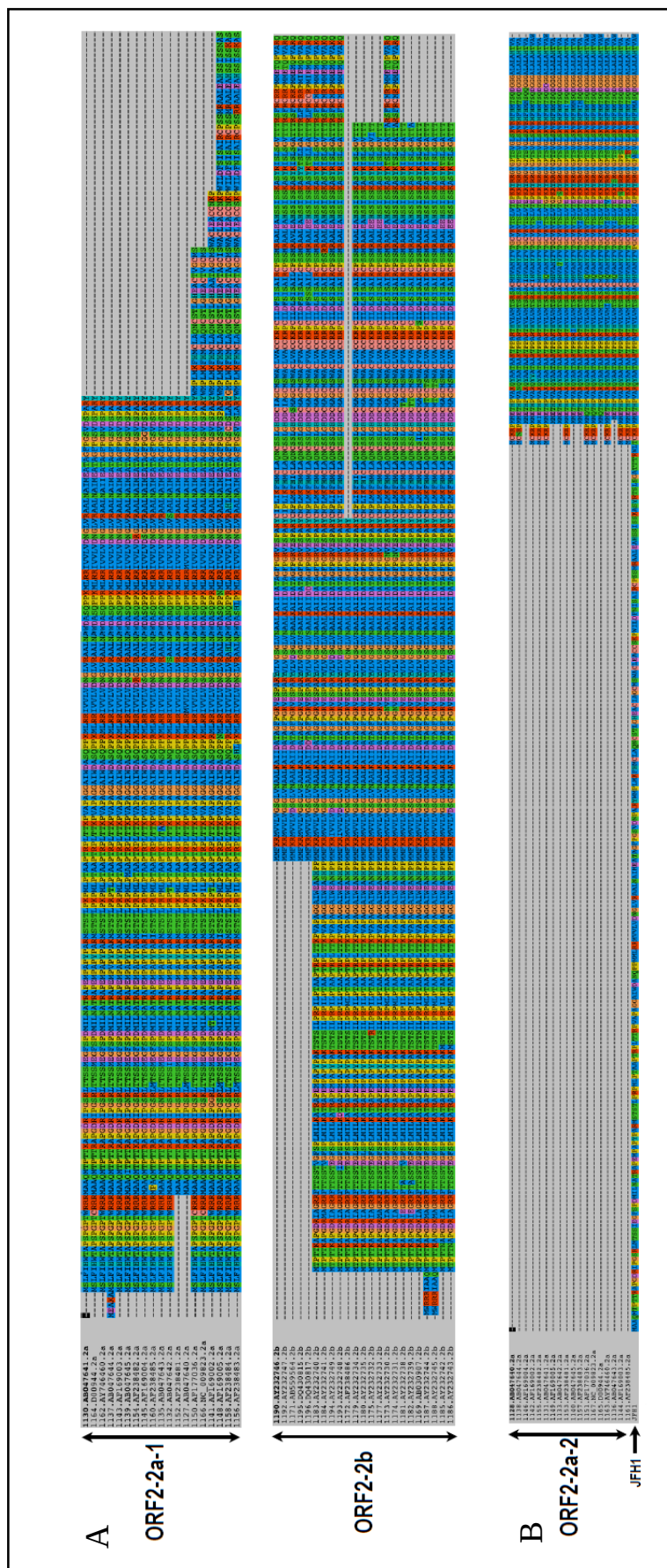


Figure 33. Représentation d'alignement de séquences protéiques codées potentiellement par l'ORF2-2a-1, l'ORF2-2b, l'ORF2-2a-2 et fin de l'ORF2. Cet alignement montre une partie des séquences protéiques dans un échantillon de génotypes 2a et 2b. Les couleurs sont déterminées en fonction de la nature des aa. L'alignement **A** montre la conservation de ORF2-2a-1 et ORF2b intra et inter-génotypiques. L'alignement **B** compare les séquences protéiques codées par l'ORF2-2a-2 et la fin de l'ORF2 du clone JFH1

B. Expression des ORFs dans le système SFV

1) Synthèse des différentes constructions

Différentes constructions ont été élaborées. Les ORF2 et ORF « c » ont évidemment été exprimés, mais également l'ORF3 (**Figure 32**) de JFH-1 utilisé en contrôle négatif, en raison de son absence dans les séquences de génotypes 2b, une caractéristique permettant de penser qu'il n'est pas essentiel au cycle viral. De plus, l'expression de la protéine de capside (Core) permettra de valider l'infection d'un patient par l'hépatite C, et donc servir comme contrôle positif.

Comme précédemment décrit, l'ORF2, l'ORF3 et la protéine de capside ont été amplifiés à partir du clone JFH-1 et d'un gène de synthèse (Genscript) pour l'ORFc, « designé » à partir d'une séquence représentative de la séquence consensus des génotypes 1a (EU155214). L'ajout de « tags » FLAG et/ou HA en C terminale et/ou N terminale a permis de faciliter leur détection en immunocytochimie, Western Blot et ELISA.

Les constructions obtenues par PCR (**Figure 34**) ont ensuite été clonées dans le vecteur pSFV1, utilisé pour sa capacité à exprimer des protéines en grande quantité dans les cellules BHK 21 après transcription *in vitro* et transfection.

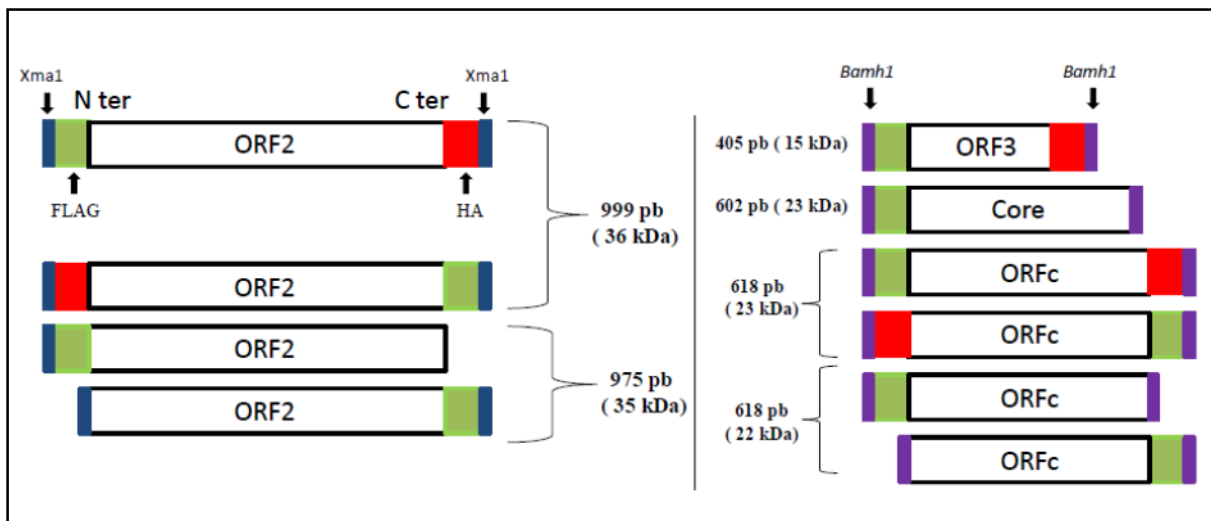


Figure 34. Schéma des différentes constructions réalisées

Les tags FLAG (en vert) et/ou HA (en rouge) ont été ajoutés en position Cterminale et/ou Nterminale sur les constructions ORF2/ORF3/Capside/ORFc. Des sites de restrictions *Bam*H1 (en violet) et *Xma*I (en bleu) sur les constructions schématisées, ont été ajoutés pour faciliter l'insertion des cassettes dans le vecteur d'expression pSFV1

2) Vérification de l'expression protéique en immunocytochimie

Après 16 heures de culture, les cellules BHK 21 transfectées par électroporation avec les ARNs transcrits *in vitro*, ont été récupérées. L'utilisation d'anticorps monoclonaux de souris anti-FLAG, anti-HA et anti-capside ont permis de visualiser par immunocytochimie les différentes protéines exprimées mais aussi de valider la réactivité de certains anticorps. Ainsi, l'ensemble des constructions a été correctement détecté par l'anticorps anti-FLAG et l'absence de fluorescence observée sur les cellules transfectées avec l'ARN codant la β -galactosidase a confirmé la spécificité du marquage (**Figure 35**). Selon le type de construction, les mêmes résultats ont été constatés avec les anticorps anti-capside ou anti-HA.

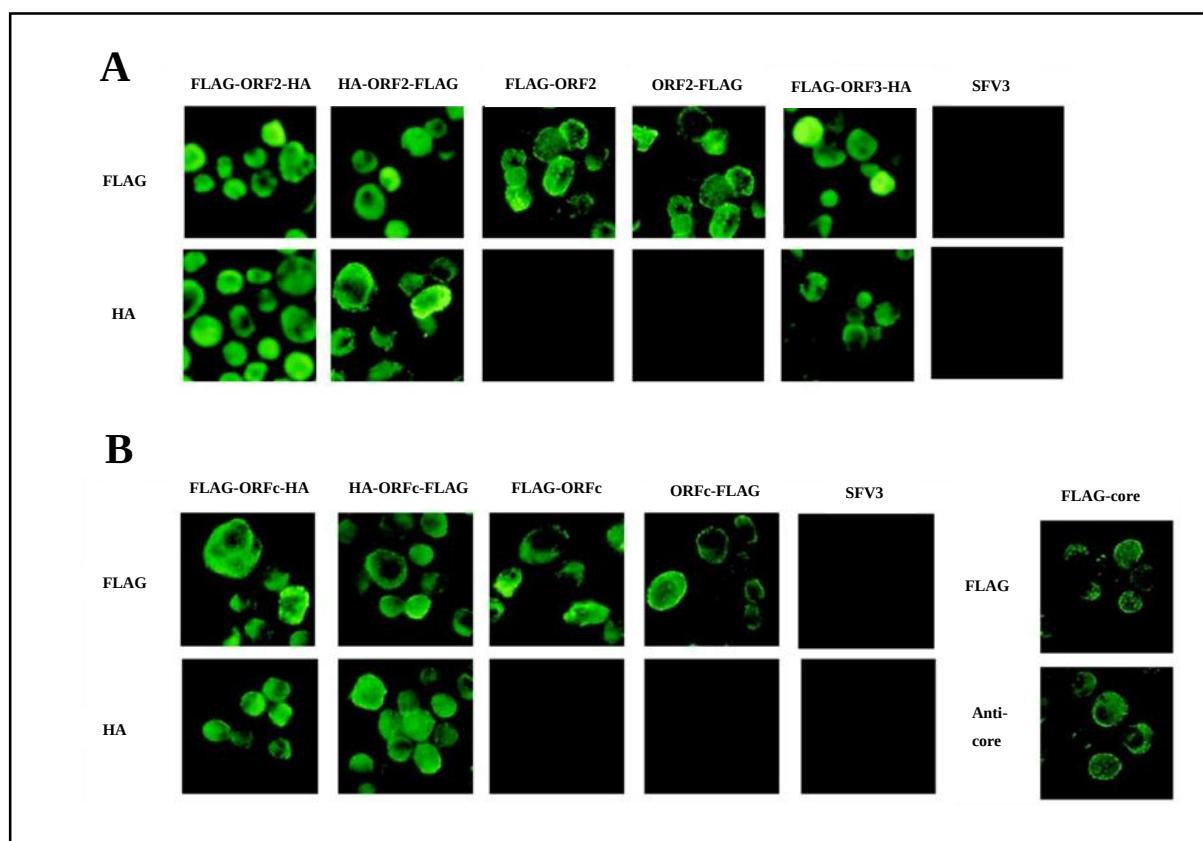


Figure 35. Analyse par immunofluorescence de l'expression des différentes protéines transfectées.

Les protéines exprimées par l'ORF2 et ORF3 (en condition d'inhibiteur de protéasome) (A) ainsi que l'ORFc et la protéine de capside (B) ont toutes été détectées en immunofluorescence. L'ajout des tags FLAG et HA a permis la révélation des protéines par des anticorps monoclonaux anti-FLAG (1/500e) et anti-HA (1/1000e) de souris. La protéine de capside a été révélée par un anti-FLAG mais aussi par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine de capside (1/200e).

3) Vérification de l'expression protéique par Western Blot

Une partie des cellules transfectées ont également été lysées et soumises à une analyse en Western Blot. Comme prévu, la révélation des protéines « taguées » en position en N-terminale a permis de détecter les protéines aux tailles attendues, avec la présence de bandes spécifiques à 35 et 23 kDa respectivement pour l'ORF2 et l'ORFc et 20 kDa pour FLAG-Core (**Figure 36**). Ces résultats étaient très similaires quel que soit l'anticorps primaire utilisé pour la détection (anti-HA, anti-Flag ou anti-capside). En revanche, la révélation des protéines possédant un tag en position C-terminale, a montré la présence de bandes, correspondant à la taille des protéines théoriques, mais aussi de manière surprenante plusieurs bandes de plus petite taille. Après une nouvelle vérification des constructions codant l'ORF « c » et de l'ORF2, la présence de ces bandes pourrait s'expliquer par une initiation de la traduction en aval du codon « Start » initial lié à la présence de codons méthionine au sein de la séquence codante.

Initialement, la protéine codée par l'ORF3 n'était pas ou peu détectée en Western Blot (non présenté), suggérant une dégradation de la protéine par le protéasome. La réalisation de transfection en présence d'un inhibiteur de protéasome a confirmé une possible dégradation de la protéine, qui est devenue détectable en présence MG-132. La demi-vie très courte de cette protéine dans notre système d'expression, suggère que la protéine pourrait être instable dans le contexte d'une hépatite C et donc inutile pour le virus, ce qui a conforté notre choix d'utiliser l'ORF3 comme contrôle négatif pour la mise au point de notre test ELISA.

En ce qui concerne le témoin négatif SFV3, aucune protéine n'a été détectée, ce qui démontre la spécificité de la détection des protéines exprimées.

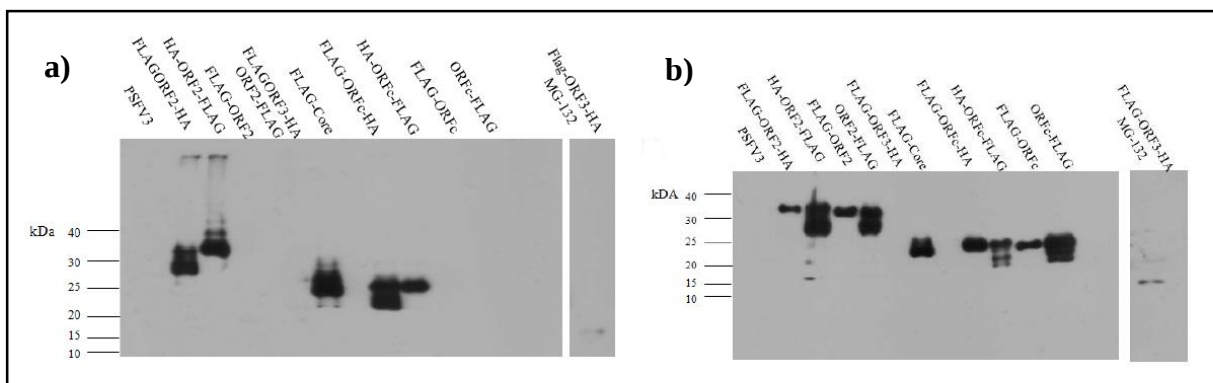


Figure 36. Analyse de l'expression des différentes protéines d'expression par western Blot
Les protéines ORF2 et ORF « c » sont représentées par une bande attendue d'une taille respective de 35kDa et de 23 kDa et révélées à l'aide de l'anticorps anti-HA (1/5000e - gel (a)) et de l'anticorps anti-FLAG (1/1000e - gel (b)). De même, la protéine de capside est révélée à 23 kDa par l'anticorps dirigé contre le tag FLAG. La bande de 15kDa correspondant à la taille de l'ORF3 est uniquement visible en présence de MG-132 dans le milieu.

C. Recherche d'anticorps dirigés contre les protéines codées par les ORF2 et ORF « c » chez les patients infectés : mise au point d'un test ELISA spécifique

Notre objectif principal est de réaliser un test ELISA de type sandwich pour révéler la présence ou non d'anticorps dirigés contre les protéines exprimées par les ORF2 et les ORF « c ». Notre stratégie a été de sensibiliser des plaques ELISA vierges avec des anticorps monoclonaux anti-FLAG, permettant de capturer spécifiquement les différentes protéines-(tag FLAG) codées par les ORF2, ORF « c », ORF3 et la protéine de capsid du VHC elle-même « taguée FLAG » en N-terminal et utilisée comme contrôle positif du test et de l'infection au VHC. Cette stratégie visait ainsi à accrocher ces protéines au cours d'une simple incubation de lysats de cellules BHK 21 transfectées dans les plaques sensibilisées par l'anticorps anti-FLAG. Après une étape de blocage des sites non spécifiques, l'incubation des sérums de patients infectés par le VHC et la révélation par un anticorps secondaire anti-humain monoclonal, couplé à la peroxydase, avait pour but de révéler la présence ou non d'anticorps dirigés contre les protéines codées par les différents ORFs sélectionnés.

1) Elaboration du test ELISA avec les lysats cellulaires

En premier lieu, la mise au point du test a été réalisée à l'aide de constructions doublement taguées par FLAG et HA permettant une capture des protéines par le domaine FLAG et une révélation par un anticorps anti-HA de lapin. Ne disposant pas d'anticorps dirigés contre les protéines codées par les ORF2 et ORF « c », cette stratégie a permis de valider l'efficacité de l'immunocapture des protéines, mais aussi de pouvoir évaluer et corriger le bruit de fond inhérent à ce type de technique. En outre, ces premiers tests ont permis de fixer la quantité nécessaire d'anticorps pour sensibiliser les plaques, de déterminer le meilleur tampon de saturation et de définir la dilution nécessaire des lysats cellulaires exprimant nos protéines d'intérêt. Au cours de cette phase de mise au point, les contrôles négatifs et positifs étaient constitués respectivement par des lysats de cellules transfectées avec le gène de la β -galactosidase (lysat SFV3 ; sans tag FLAG ou HA) révélés par un anticorps anti-HA ou anti-capsid, et des lysats de cellules transfectées avec une construction de capsid du VHC

possédant un tag FLAG révélé par l'anticorps anti-capside. Après optimisation des différents paramètres (voir légende de la **figure 37**), les résultats de l'ELISA pour les contrôles négatifs ont été utilisés pour calculer la valeur seuil (VS) du test définie comme :

$$V_s = (\sum(DO_{\text{contrôles négatifs}}) / \text{nombre de puits mesurés}) \times 3.$$

(DO ; pour densité optique mesurée)

Cette valeur seuil a ensuite permis de standardiser et d'exprimer les résultats (R) obtenus après incubation des différents lysats, en multiples de la valeur seuil (**Figure 37**) grâce à la formule suivante :

$$R = DO / V_s$$

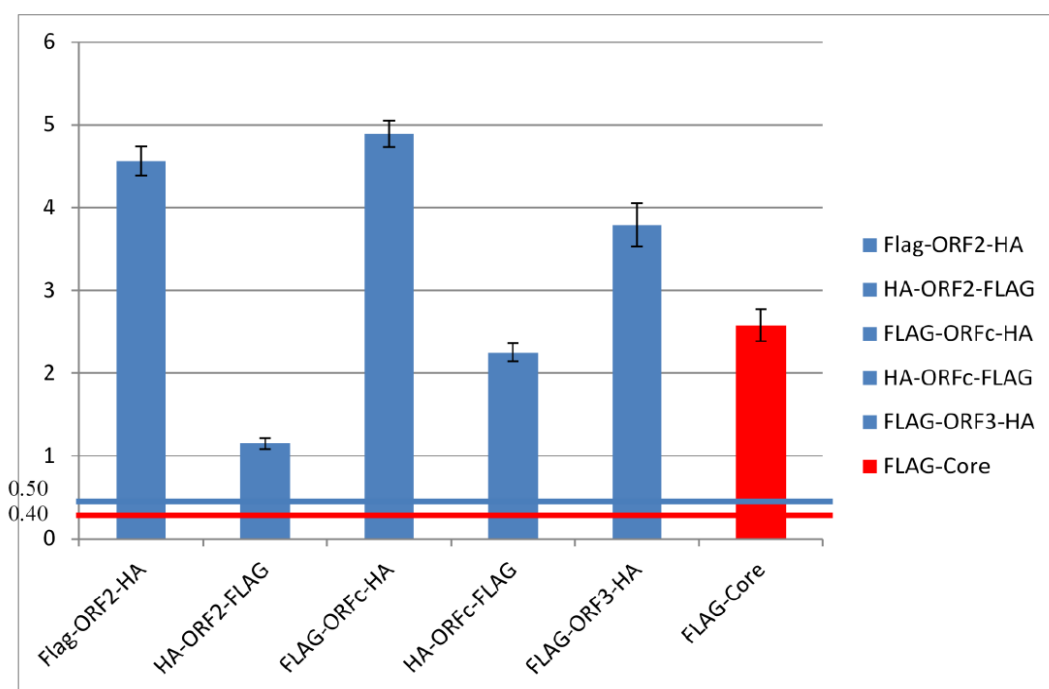


Figure 37. Graphique représentant la révélation des protéines exprimées en test ELISA

Les lysats cellulaires produisant FLAG-ORF2-HA ; HA-ORF2-FLAG ; FLAG-ORFc-HA ; HA-ORFc-FLAG et FLAG-ORF3-HA (en bleu) ont été révélés avec un anticorps anti-HA de lapin. Les lysats SFV3 (contrôle négatif) ont été révélés par incubation soit de l'anticorps anti-HA, soit comme pour le lysat FLAG-core (contrôle positif) par un anticorps anti-capside humain. La valeur seuil calculée après révélation par un anticorps anti-HA est représentée par la ligne bleue ; la valeur seuil calculée après incubation de l'anticorps anti-capside est représentée par la ligne rouge. Chaque valeur d'histogramme et les écarts types ont été calculés après réalisation de 4 manipulations indépendantes dans les mêmes conditions. Ces résultats ont été obtenus avec une quantité de 2 µg/puits d'anticorps anti-FLAG ; un tampon de saturation composé de 5% de lait en poudre, 0,5 % de Tween 20 dilués dans du PBS 1x ; une dilution au 1/20 des lysats de cellules transfectées.

Les résultats de ces tests de mise au point montrent que l'ensemble des protéines possédant le tag FLAG sont capturées de façon satisfaisante par l'anticorps anti-FLAG adsorbé à la surface de la plaque ELISA. Le bruit de fond évalué par la valeur seuil calculée est très faible (quel que soit l'anticorps primaire utilisé pour la révélation), soulignant ainsi le faible bruit de fond de la technique, et rendant très significatifs les résultats lorsqu'ils sont positifs. On peut néanmoins noter que les constructions comportant le tag FLAG en position C-terminal sont faiblement détectées dans notre test (HA-ORF2-FLAG et HA-ORFc-FLAG). Ces résultats confirment ceux obtenus en Western Blot. La présence probable de plusieurs sites d'initiation de la traduction dans ces constructions conduit vraisemblablement à la synthèse de protéines tronquées et dépourvues de tag HA en position N-terminal. Cela induit donc l'absence de leur détection par l'anticorps anti-HA, bien qu'immobilisées sur la phase solide par le tag FLAG en position C-terminal. Ce problème n'est pas présent lorsque les protéines possèdent le tag FLAG en position N-terminal, puisque dans ce cas précis, seules les protéines traduites à partir du premier codon d'initiation sont immobilisées sur la plaque ELISA (FLAG-ORF2-HA, FLAG-ORFc-HA, FLAG-ORF3-HA et FLAG-Core).

Cette phase de mise au point a ainsi permis de sélectionner que les protéines possédant un tag FLAG en position N-terminal pour la réalisation des tests futurs avec les sérums de patients, bien que cette stratégie ne permette pas de choisir l'orientation des protéines immobilisées au fond de la plaque ELISA.

2) Réalisation des tests ELISA sur les sérums de patients

Pour la réalisation de ces tests, les protéines FLAG-Core et FLAG-ORF3-HA (ORF peu conservé au sein des génotypes 1 et 2) respectivement utilisées comme contrôle positif et contrôle négatif ont été utilisées pour la validation de la technique sur des sérums de patients non infectés ou des patients infectés par le VHC, ces derniers ayant été sélectionnés pour leur forte réactivité vis à vis de la protéine de capsid (évaluée en routine hospitalière par une technique de détection analytique des Ac anti-VHC : INNO-LIA HCV Score, Innogenetics). Ces premiers résultats ont permis de fixer à 1/100e la dilution des sérums pour l'incubation dans notre test.

Un premier groupe de 12 sérums a d'abord été testé, dont 9 étaient issus de patients infectés par des virus de génotypes 1 et 2. Ces sérums ont été prélevés à l'occasion d'un bilan pré-thérapeutique. Les trois autres sérums étaient issus de patients non infectés par le VHC (Ac anti-VHC négatif, ARN du VHC négatif). Les résultats de l'évaluation de ces sérums montrent qu'aucune réactivité vis à vis de la protéine de capside n'a été mesurée chez les patients non infectés par le VHC (**Figure 38**). Ceci souligne la spécificité satisfaisante du test ELISA mis au point. A l'inverse, l'analyse des sérums des patients infectés montre que tous possèdent des anticorps anti-capside avec des titres variables. Ces résultats attendus, en dehors de confirmer la présence d'anticorps dirigés contre le VHC permettent en outre de valider (partiellement, uniquement pour la construction FLAG-Core) l'efficacité de l'immunocapture de nos protéines dotées du Tag FLAG.

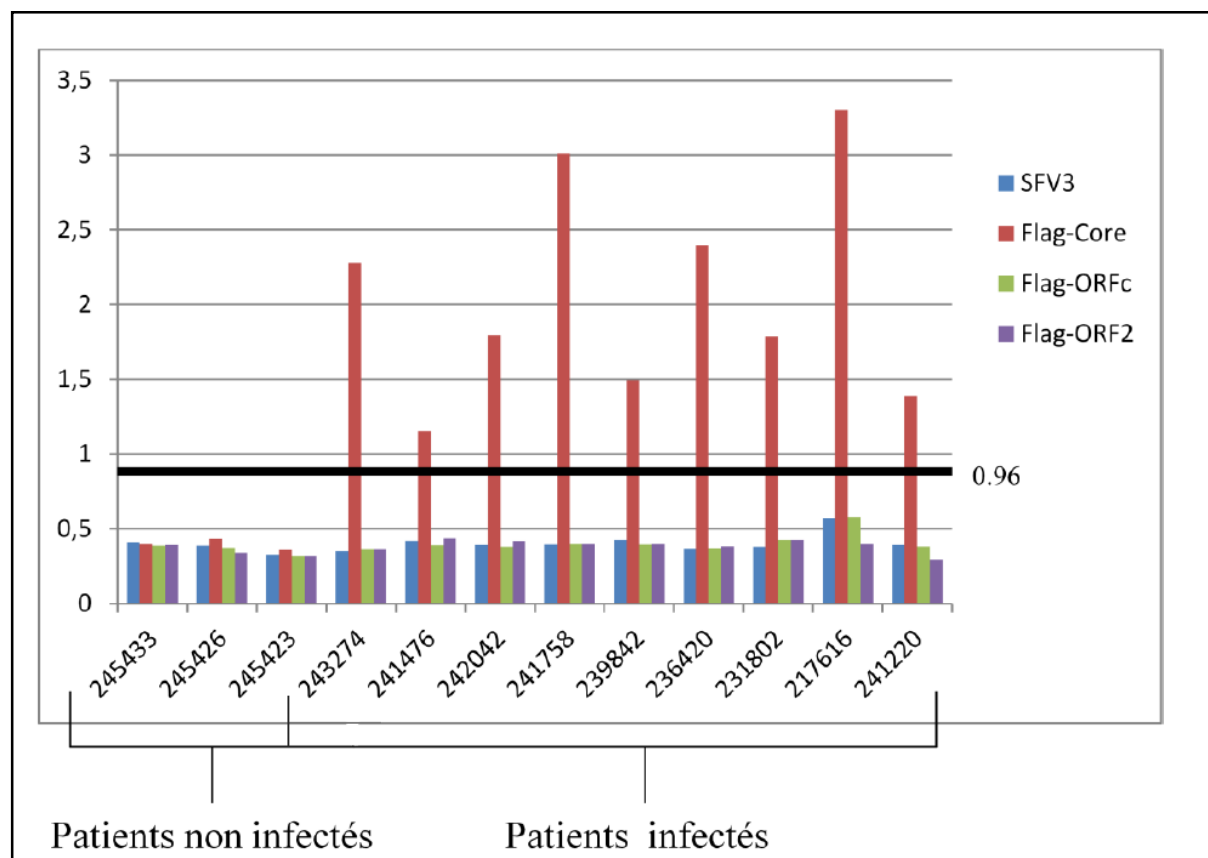


Figure 38. Détermination par test ELISA de la présence d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 et l'ORFc dans des sérums de patients

Les numéros déterminent un sérum de patient. Les couleurs représentent les lysats de cellules transfectées avec les constructions suivantes : bleu : SFV3 (β -galactosidase) ; rouge : FLAG-Core ; vert : FLAG-ORFc ; violet : FLAG-ORF2. La valeur seuil calculée comme 3x la moyenne des densités optiques des résultats obtenus avec FLAG-ORF3 est de 0,96 (barre horizontale noire). Tous les sérums de patients ont été dilués au 1/100e.

En dehors de cette réactivité contre la protéine de capsid du VHC, aucun des sérums de patients infectés ne semble présenter d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 ou l'ORFc. Conscient du faible effectif évalué lors cette première série de prélèvements, une seconde série de 16 sérums a été sélectionnée et évaluée par notre technique. Cette seconde série d'échantillons a conduit à des résultats similaires aux précédents, avec l'absence ou la non détection d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 ou l'ORF « c ».

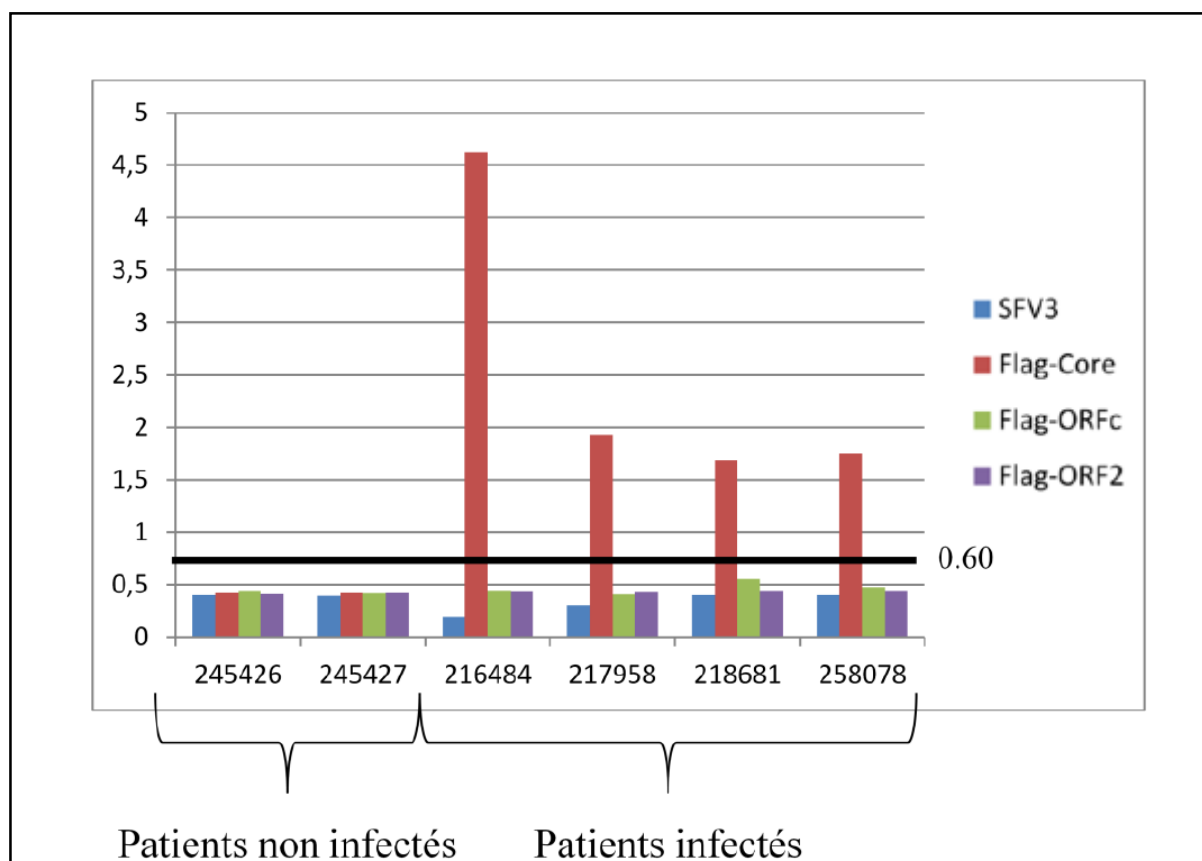


Figure 39. Détermination par test ELISA de la présence d'anticorps dirigés contre les protéines codées par l'ORF2 et l'ORFc dans des sérums de patients atteint d'hépatocarcinome

Les couleurs représentent les lysats de cellules transfectées avec les constructions suivantes : bleu : SFV3 (β -galactosidase) ; rouge : FLAG-Core ; vert : FLAG-ORFc ; violet : FLAG-ORF2. La valeur seuil calculée comme 3x la moyenne des densités optiques des résultats obtenus avec FLAG-ORF3 est de 0,60 (barre horizontale noire). Tous les sérums de patients ont été dilués au 1/100e.

Du fait des caractéristiques particulières du clone JFH-1, notamment le fait que ce génome ait été cloné à partir d'un patient atteint d'une hépatite fulminante (rare complication de l'infection à VHC), un troisième groupe de sérums a ensuite été constitué en sélectionnant des patients ayant subi récemment une greffe de foie en lien avec le développement d'une cirrhose de stade avancé ou d'un hépatocarcinome lié au VHC. Seulement 6 patients ont été inclus dans ce

groupe, et les résultats de l'évaluation de 4 de ces sérums sont présentés dans la **figure 39**. Ce faible effectif, lié à l'activité de greffe hépatique récemment développée au CHU de Tours, n'a pas permis d'inclure le critère du génotype dans notre sélection. De ce fait, 3 des 6 patients dont le sérum a été testé étaient infectés par une souche de génotype 3. Toutefois une étude bio-informatique succincte a montré la présence d'un ORF en phase, situé dans la région de l'ORF2 et dont la séquence protéique est conservée à 60% avec l'ORF « c » dans les séquences de génotype 3. Les résultats montrent un résultat positif sur la protéine de capsid pour tous les sérums testés de cette cohorte, soulignant la présence d'anticorps spécifiques présents chez l'ensemble des patients. Comme précédemment aucun anticorps anti-ORF2 ou ORF « c » n'ont cependant été détectés dans les sérums.

D. Expression d'un génome JFH-1 déficient pour la production de la protéine codée par la séquence de l'ORF 2

A la suite de ces résultats de tests ELISA, nous avons recherché le rôle potentiel de la protéine codée par l'ORF2 *in vitro*. Pour cela, nous avons introduit des mutations dans la séquence du clone JFH-1 avec l'objectif de bloquer la production de la protéine ORF2. Etant donné l'existence de plusieurs codons initiateurs en phase dans la séquence de l'ORF2, nous avons inséré trois codons stop repartis au sein de cette séquence. Ces mutations ont également été choisies pour être silencieuses pour le brin positif de l'ARN viral. Evaluée de façon comparée au génome JFH-1 sauvage, notre mutant neutralisant la production de l'ORF2 a cependant présenté la même efficacité de réplication que la souche parentale. Aucune distinction significative n'a été identifiée entre les cellules transfectées avec le clone JFH-1 sauvage ou inactivé pour ORF2, en termes d'évaluation du pourcentage de cellules infectées, d'interaction de la protéine de capsid avec les gouttelettes lipidiques, ou de dosage de l'ARN extracellulaire. Enfin, après immunisation de souris avec un peptide immunogène de l'ORF2, la réalisation d'immunomarquages spécifiques avec les anticorps polyclonaux obtenus n'a pas permis de révéler la synthèse de la protéine ORF2 au cours du cycle viral en présence du clone JFH-1 sauvage, la spécificité de ces immunomarquages ayant été par ailleurs évaluée sur cellules exprimant de façon ectopique la protéine codée par l'ORF2.

**Projet n°3 : Etude de résidus de la protéine de capsid
impliqués dans les mécanismes d'assemblage et de sécrétion
du virus**

Objectifs des travaux de recherche

Ces dernières années plusieurs travaux ont montré que les phases d'assemblage du clone JFH-1 n'étaient pas optimales, et la mise au point de génomes chimères entre deux souches de génotype 2, J6 et JFH-1 a permis de confirmer ces suppositions avec l'obtention pour ces chimères de titres viraux significativement plus élevés qu'avec la souche parentale. Avec la mise au point de ces génomes chimères et leur optimisation (définition précise de la zone de jonction dans la protéine NS2), plusieurs travaux utilisant la chimère de référence « Jc1 » ont montré que les protéines structurales de la séquence JFH-1, en particulier la protéine de capsid, étaient responsables de la faible efficacité de production des particules virales dans la souche JFH-1 sauvage (Pietschmann *et al.*, 2006; Shavinskaya *et al.*, 2007). Dans ce projet, notre équipe s'est donc attachée à analyser finement les séquences protéiques des capsides issues des séquences J6 et JFH-1, mais aussi de la séquence de génotype 1a « Dj » utilisée au laboratoire. Ces comparaisons de séquences ont également été étendues à l'ensemble des séquences de capsides issues de génomes complets et présents dans la base de données HCV de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov/content/index>). La réalisation de multiples alignements de nos séquences de laboratoire et des séquences de la base de Los Alamos classées par génotypes ou non ont permis l'identification d'une dizaine de résidus particulièrement singuliers présents dans la séquence de capsid JFH-1. L'impact de chacun résidus a été étudié dans les phases d'assemblage du VHC en les substituant par mutagenèse dirigée par les résidus les plus couramment retrouvés à ces positions. Ainsi, les mutants générés ont été étudiés comparativement aux séquences de capsid issues de JFH-1, de la souche J6 ou de notre séquence Dj. Deux modèles *in vitro* ont été utilisés, d'une part le système d'expression SFV pour évaluer les propriétés intrinsèques de nos protéines de capsid (à l'instar de nos précédents travaux publiés sur le sujet) et d'autre part le système VHCcc permettant d'évaluer les capacités d'assemblage et de sécrétion des particules virales, dans le contexte de génomes complets répliatifs.

A. Analyses de séquences

Le génome JFH-1 reste à ce jour le seul capable d'effectuer un cycle infectieux complet *in vitro*. Néanmoins, la réalisation des chimère FL-J6/JFH-1 et Jc1, constituées des protéines structurales du génome J6 et respectivement de tout ou partie de NS2 dans le contexte du clone JFH-1, est capable d'une production virale supérieure à celle de JFH-1 démontrant ainsi une probable déficience partielle des protéines structurales du JFH-1 dans les mécanismes tardifs de l'assemblage et la sécrétion des particules virales. Plus précisément, les travaux de Shavinskaya et coll. ont montré que la seule présence de la protéine de capsid du génome J6 clonée dans un génome de la souche JFH-1 était suffisante pour augmenter les titres infectieux, un résultat par ailleurs corrélé avec une plus faible colocalisation de la protéine de capsid avec les gouttelettes lipidiques (Shavinskaya *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous avons analysé finement la séquence de capsid du génome JFH-1 afin de déterminer des résidus particuliers qui pourraient être responsables de sa faible production virale *in vitro*.

Pour se faire, nous avons extrait 883 séquences de génotype 1, 57 de génotypes 2 et 130 appartenant aux autres génotypes à partir des séquences déposées dans la base de donnée HCV de Los Alamos. Après traduction *in silico*, les séquences de protéine de capsid obtenues ont été comparées à celles disponibles au laboratoire : la capsid JFH-1, la capsid J6 (faisant partie des chimères FL-J6/JFH-1 et Jc1) et la capsid Dj de génotype 1 ayant fait l'objet de plusieurs études en système SFV (Blanchard *et al.*, 2002; Ait-Goughoulte, 2006; Hourieux *et al.*, 2007). Les analyses ont montré que les séquences de capsid Dj et J6 présentaient une forte homologie avec leur consensus respectifs. En revanche, de façon assez surprenante, la séquence de capsid du clone JFH-1 a montré qu'elle présentait 10 résidus (positions 20, 48, 75, 81, 91, 145, 147, 151, 172 et 173) particuliers, une majorité d'entre eux n'étant retrouvés qu'avec une très faible fréquence dans les autres séquences de génotypes 2, ou présents uniquement dans le clone JFH-1 (**Figure 40**). A titre de comparaison, les résidus de J6 et Dj à ces positions étaient très conservés par rapport à la séquence consensus de leur génotype. Ainsi, cela démontre la singularité de la protéine de capsid de JFH-1 puisque pas moins de 7 résidus de sa séquence ne sont pas retrouvés au sein même des séquences de génotype 2, deux autres ne le sont que très faiblement (positions 48 et 75) et une ne l'est que dans 50% des cas (position 91). Enfin, l'analyse des séquences de capsid génotypes autre que 1 et 2 a montré que 9 de ces 10 résidus

étudiés étaient identiques à ceux des consensus génotype 1 et 2, renforçant encore le caractère très particulier de la séquence issue du clone JFH-1 au sein de notre étude comparative.

Dans ce projet, nous sommes partis de l'hypothèse que ces dix résidus particuliers présents dans la protéine de capsid de JFH-1 pouvaient potentiellement être responsables des faibles capacités d'assemblage et de sécrétion de virus infectieux *in vitro* en système VHCcc (Shavinskaya *et al.*, 2007). Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons développé une protéine de capsid mutant nommée « S8 », basée sur le squelette de la séquence de capsid JFH-1 mais dont les 10 résidus particuliers ont été remplacés par ceux plus communément retrouvés au sein des génotypes 1 et 2 (**Figure 40**).

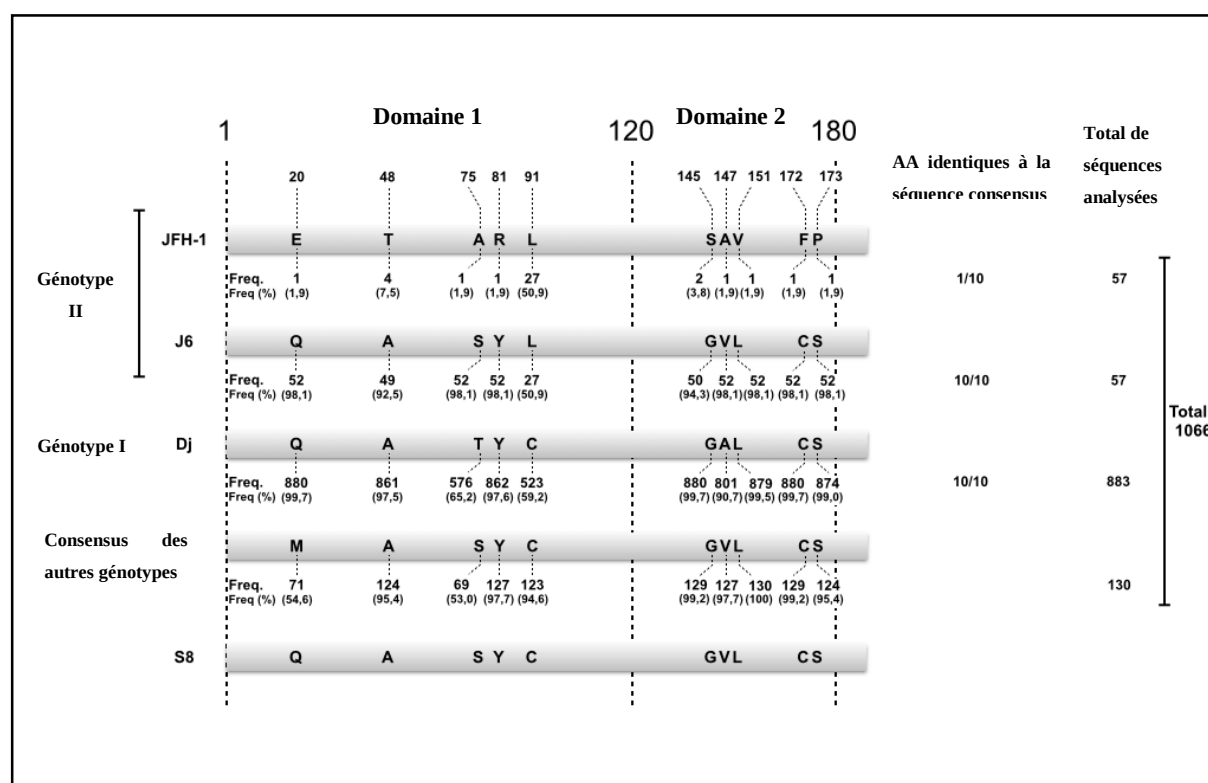


Figure 40. Résultats de l'analyse comparative de séquences de la protéine de capsid du VHC

La comparaison est effectuée par rapport aux dix résidus particuliers de la séquence de capsid de JFH-1. Pour chaque séquence, la fréquence des résidus au sein de son génotype est indiquée (en effectif et pourcentage). Sur la droite du schéma est précisé le nombre de résidus étudiés retrouvés dans la séquence consensus correspondante ainsi que le nombre total de séquences analysées pour chaque génotype

B. Expression de la protéine de capsid S8/JFH-1 à l'aide du système SFV

Une première approche de l'étude de la capsid S8 a consisté à comparer ses capacités d'assemblage et d'interactions avec les gouttelettes lipidiques par rapport aux protéines de capsides issues de JFH-1, Dj et J6, en utilisant le système d'expression dérivé du SFV.

1) Analyse en microscopie confocale

L'étude de l'interaction entre nos différentes protéines de capsides et les gouttelettes lipidiques a été réalisée en lignée cellulaire FLC4. Le marquage au Nile Red des gouttelettes lipidiques au sein de cellules FLC4 contrôles exprimant le gène de la β -galactosidase a montré une distribution répartie de façon assez homogène dans le cytoplasme de cellules (**Figure 41**). La transfection avec la capsid Dj induit une relocalisation en zone périnucléaire des gouttelettes lipidiques en surface desquelles est retrouvée la protéine de capsid comme cela a précédemment été démontré au laboratoire (Ait-Goughoulte, 2006; Hourieux *et al.*, 2007). Comme attendu, un phénomène identique a été observé lors de l'expression des protéines de capsides JFH-1 et J6 (**Figure 41**). Enfin, l'examen de localisation de la protéine de capsid mutée S8 a montré qu'elle présentait des résultats similaires, les mutations insérées (plus particulièrement celles du domaine D2) n'ayant pas d'incidence significative sur la capacité de la protéine de capsid à interagir avec les gouttelettes lipidiques (**Figure 41**). En conclusion, les résultats obtenus en cellules FLC4 ont montré que l'ensemble des protéines de capsid étudiées présentaient en microscopie confocale des propriétés similaires, montrant une interaction avec les gouttelettes lipidiques cellulaires associée à leur relocalisation au niveau périnucléaire. Ainsi, la mutation des dix résidus peu conservés dans la protéine de capsid JFH-1 ne semble pas perturber significativement les propriétés d'association de la protéine aux lipides cellulaires.

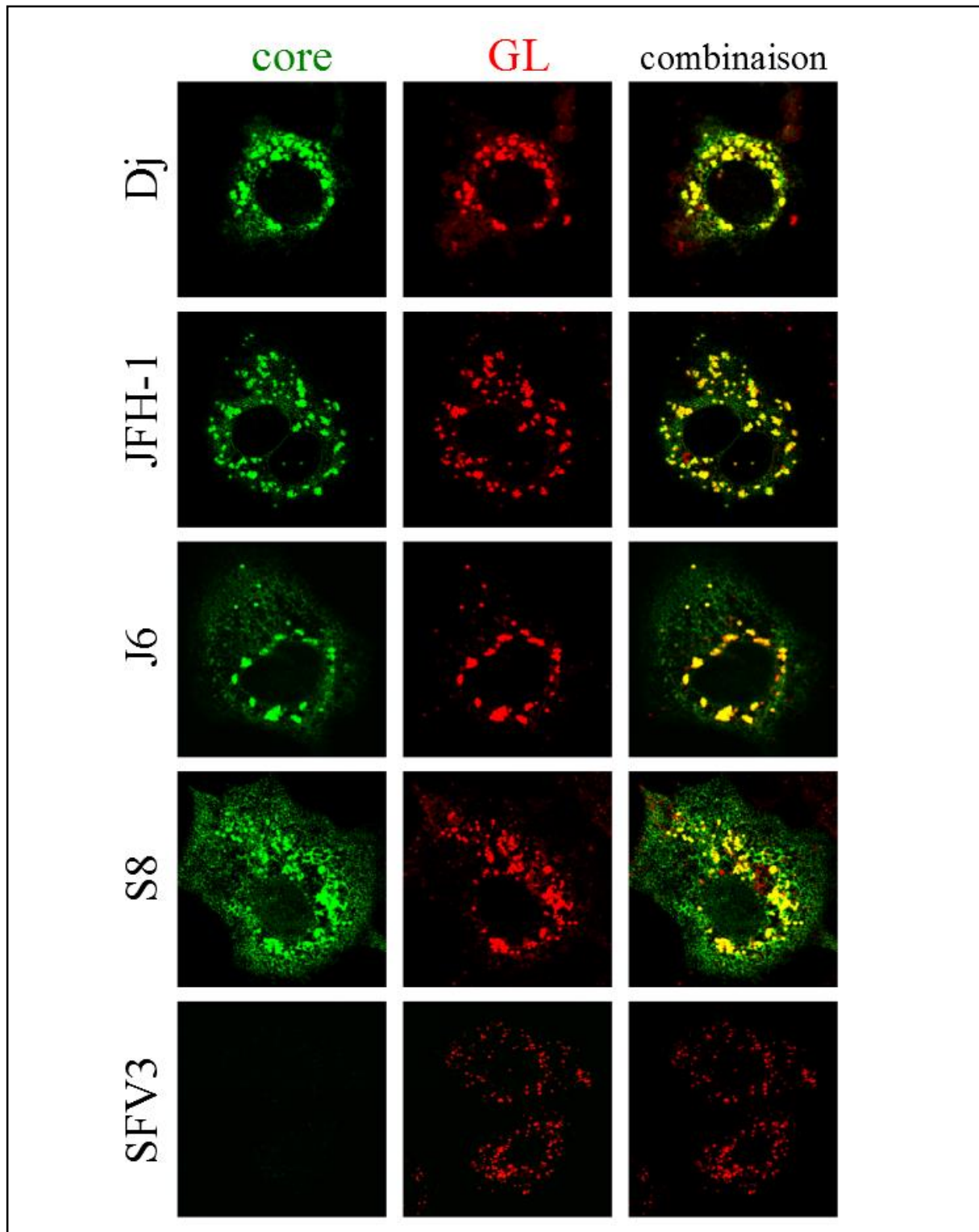
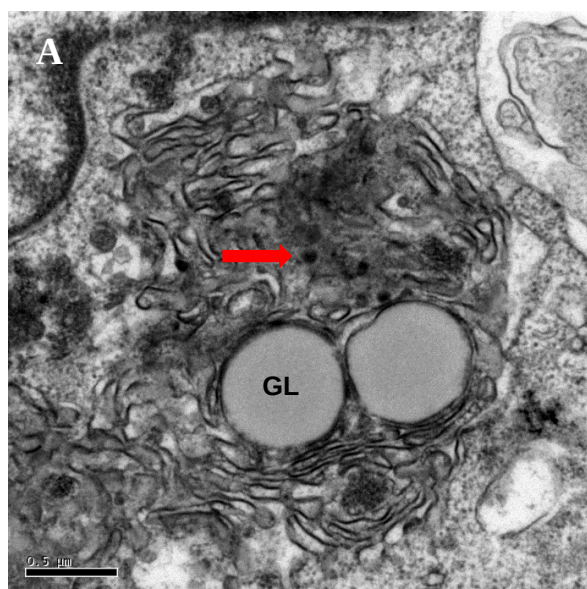


Figure 41. Analyse en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des différentes protéines de capsid et de la répartition des gouttelettes lipidiques en cellules FLC4.
 La protéine de capsid a été immunomarkée à l'aide de l'anticorps monoclonal C7-50, les gouttelettes lipidiques sont révélées à l'aide du Nile Red

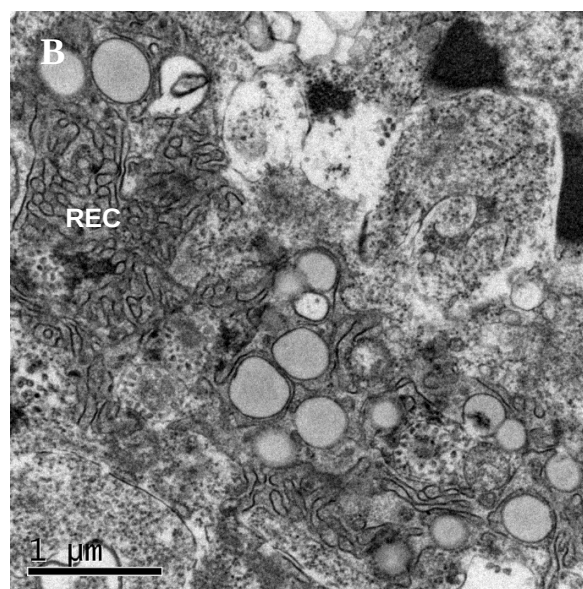
2) Analyse en microscopie électronique

Bien que les résultats obtenus en microscopie confocale n'aient pas permis la distinction de propriétés particulières entre les protéines de capsides étudiées, l'analyse en microscopie électronique a permis de révéler des différences importantes sur le plan ultrastructural. La réalisation d'immunomarquages en billes d'or a permis d'observer une localisation de la protéine de capsidite au niveau des membranes du RE ainsi qu'à la surface des gouttelettes lipidiques pour toutes les capsides testées (**Figure 43**), mais cependant, de grandes différences dans leur capacité à induire la formation de VLPs ont été notées. En adéquation avec les précédents travaux de l'équipe (Hourieux *et al.*, 2007), les cellules BHK 21 exprimant la protéine de capsidite Dj présentaient des membranes de RE circonvolutées associées à de multiples bourgeonnement de pseudoparticules (**Figure 42A**). Ces modifications morphologiques associées à l'expression de la protéine de capsidite sont absentes des cellules exprimant la β -galactosidase qui n'engendre aucune modification visible des membranes du RE (**Figure 42E**). De façon particulièrement surprenante, l'observation des cellules exprimant la protéine de capsidite du clone JFH-1, bien que présentant des membranes du RE modifiées, n'a pas permis d'identifier le bourgeonnement de VLPs (**Figure 42B**), même après observation de plusieurs coupes ultrafines issues de trois expériences différentes. Parallèlement, les cellules produisant la protéine de capsidite J6 présentaient de nombreuses structures tubulaires, issue de la multimérisation de la protéine de capsidite comme le confirme l'immunomarquage spécifique en billes d'or (**Figure 42D et 43**). De façon intéressante, l'observation des cellules exprimant la protéine de capsidite S8 a montré des résultats très différents de ceux obtenus avec la protéine de capsidite JFH-1, en présentant un profil intermédiaire à ceux des protéines de capsidite J6 et Dj. Avec cette séquence, il était possible d'observer de façon concomitante des mécanismes de bourgeonnement de pseudovirions assez similaires à ceux identifiés avec la protéine de capsidite Dj, mais également la présence de structures tubulaires retrouvées avec l'expression de la capsidite J6 (**Figure 42C**). En conclusion, en système d'expression SFV, les mécanismes de multimérisation de la protéine de capsidite aboutissant à la formation de pseudovirions montrent qu'ils sont très dépendants de la séquence de la protéine de capsidite, voire de quelques résidus sélectionnés dans cette protéine. Bien que la composition de la séquence de la protéine de capsidite soit importante pour la conservation de ses propriétés d'assemblage et de multimérisation ; ceci ne semble pas influencer significativement sur sa localisation au niveau des membranes du RE et des gouttelettes lipidiques dès l'instant que les résidus modifiés (comme dans la protéine de capsidite S8) sont remplacés par des acides aminés couramment retrouvés

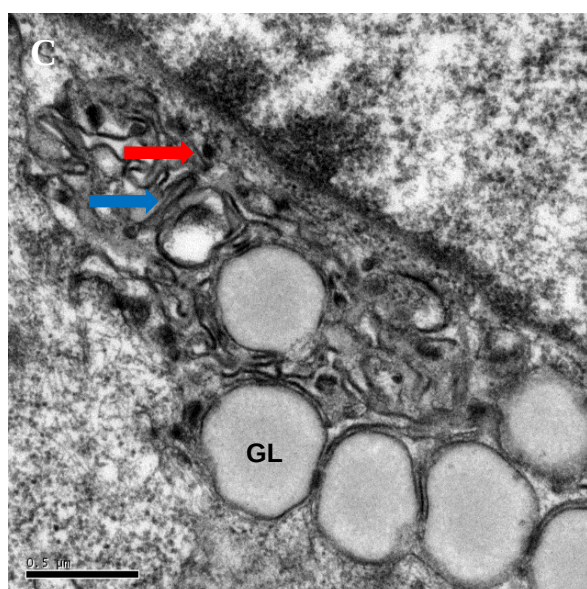
dans les bases de données HCV. Enfin, même si le système d'expression SFV constitue un modèle très éloigné du modèle de propagation du VHC en cellules Huh 7.5, nos résultats semblent montrer que la protéine de capside du clone JFH-1 possède intrinsèquement des capacités déficientes pour la formation de VLPs, qui pourraient être de nature à expliquer les faibles titres viraux observés en systèmes HCVcc, comparativement à ceux obtenus avec aux chimère FL-J6/JFH-1 et Jc1 incorporant une séquence de capside issue du clone J6.



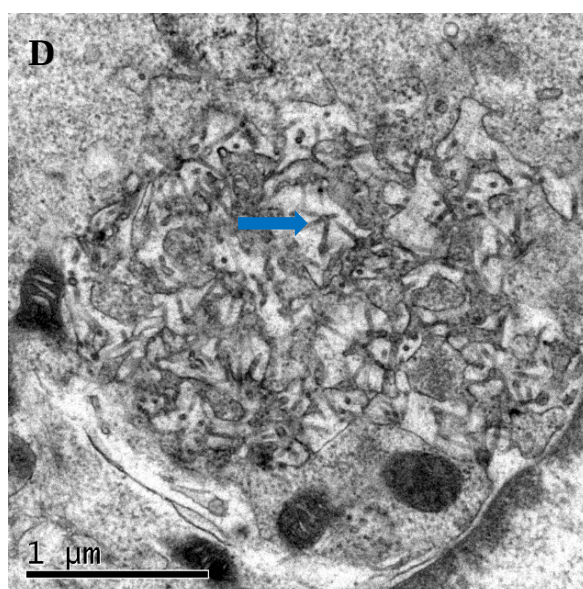
C191 Dj



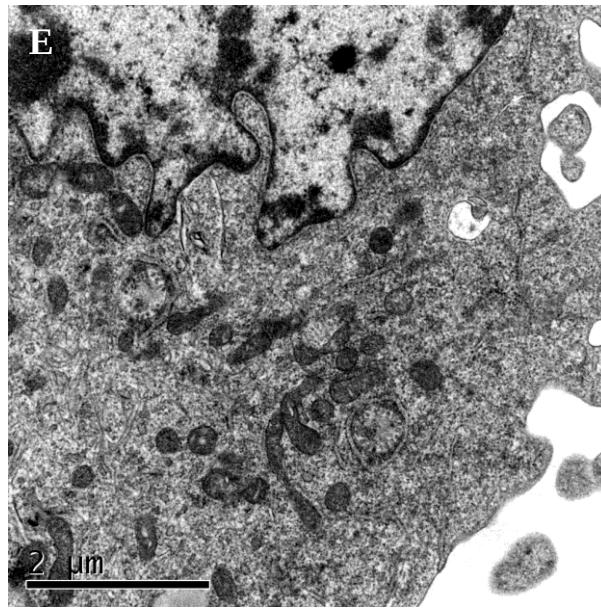
C191 JFH-1



C191 S8



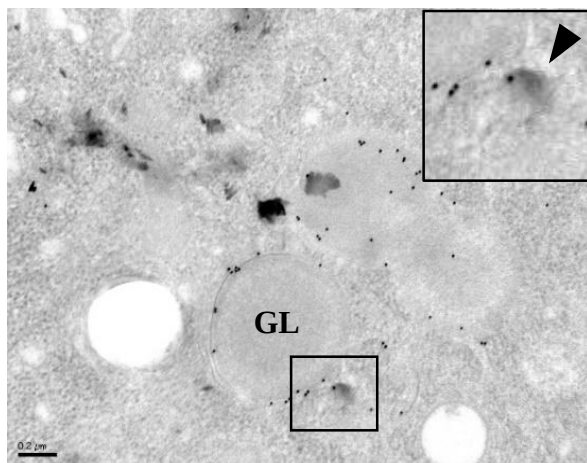
C191 J6



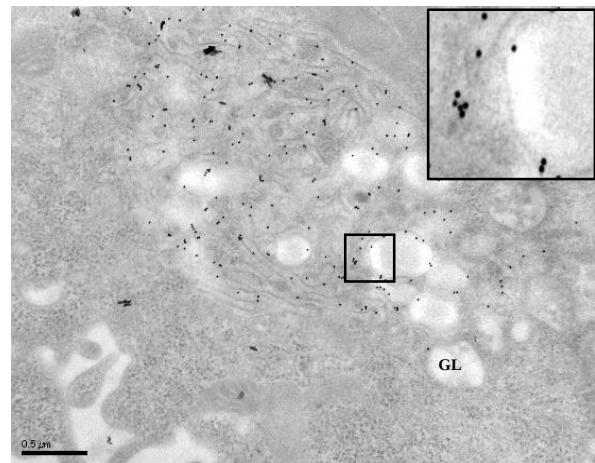
SFV3

Figure 42. Micrographies électroniques de sections ultrafines de cellules BHK-21 transfectées avec les différentes séquences de capsides étudiées.

Les constructions C191 DJ et C191 S8 présentent des bourgeonnements de pseudoparticules à partir des membranes du RE (Flèches rouges). Les protéines de capside C191 J6 et, dans une moindre mesure, C191 S8 forment des structures tubulaires (Flèches bleues). La protéine C191 JFH-1 n'induit qu'une modification des membranes du RE, phénomène observé pour les autres protéines de capside. GL : gouttelette lipidique ; REC : RE circonvoluté.



C191 Dj



C191 JFH-1

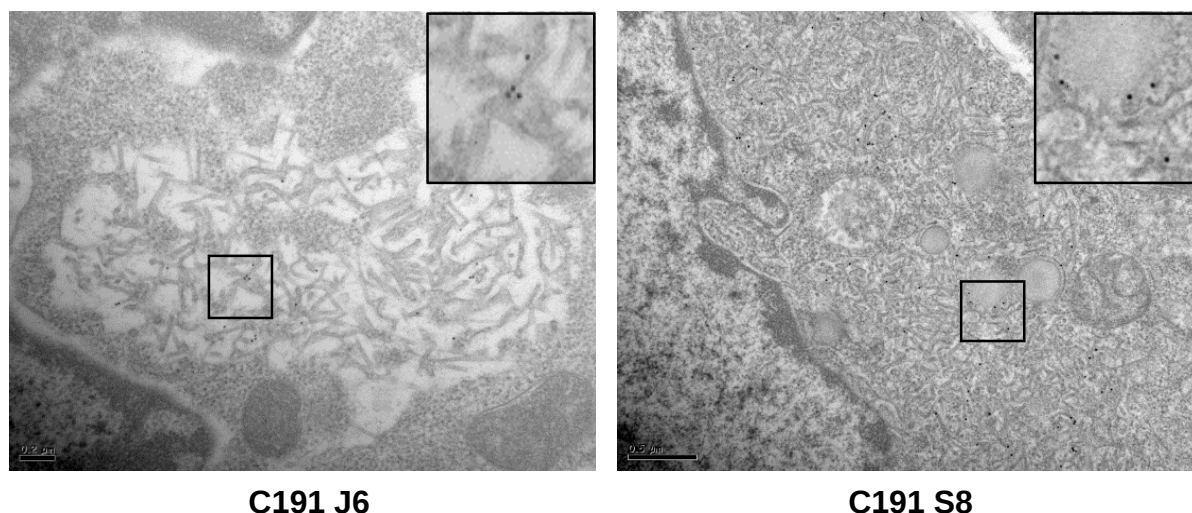


Figure 43. Immunomarkage en microscopie électronique de la protéine de capsid du VHC

Les billes d'or sont retrouvées à la surface des gouttelettes lipidiques ou au sein des membranes du RE pour les constructions C191 Dj, C191 JFH-1 (Encart) et C191 S8 (encart). Un marquage est observé au sein des pseudo-bourgeonnements présentés par C191 S8 (encart) et des structures tubulaires de C191 J6 (encart).

C. Expression et étude du génome complet S8/JFH-1

Suite aux observations précédentes, il est apparu que l'insertion de 10 mutations dans la séquence de la protéine de capsid JFH-1 conférait à cette dernière de nouvelles propriétés d'assemblage. Néanmoins, l'expression de cette nouvelle protéine de capsid S8 à l'aide du système de surexpression SFV ne permet pas d'évaluer les interactions potentielles de la protéine avec les autres protéines virales (non exprimées) dont certaines sont directement impliquées dans les étapes de morphogénèse. Pour s'affranchir de ces limites, nous avons donc introduit la séquence de la capsid S8 dans le génome JFH-1 complet. Après transcription *in vitro* de ce génome S8/JFH-1 entier, des cellules Huh 7.5 ont été transfectées avec cette construction et comparées à des cellules transfectées avec la souche sauvage JFH-1 et la chimère FL-J6/JFH-1, toutes deux utilisées en tant que constructions de références (**Figure 44**). De par les propriétés présentées par la protéine de capsid issue du génome Dj, il nous semblait intéressant d'introduire également sa séquence dans le clone JFH-1 afin d'évaluer ses propriétés dans le contexte d'un modèle répliatif complet. Cependant, cette chimère Capsid Dj/JFH-1 a rapidement montré qu'elle ne se propageait pas en cellules Huh 7.5 et de ce fait a rapidement été abandonnée.

Afin de comparer les propriétés de S8/JFH-1, de la souche JFH-1 et de la chimère FL-J6/JFH-1, nous avons tout d'abord évalué la réplication de l'ARN de chacune de ces constructions par quantification relative des ARN intracellulaires en RT-qPCR à différents temps post transfection (3,5 et 7 jours) (**Figure 45**). Les résultats de ces analyses ont montré, comme attendu (Pietschmann *et al.*, 2006), que les quantités d'ARN viral intracellulaire étaient comparables entre les constructions JFH-1 et FL-J6/JFH-1, indiquant des capacités de réplication équivalentes. L'expression de la construction S8/JFH-1 a également présenté une efficacité de réplication très similaire à celle des deux précédentes constructions (**Figure 45**), suggérant ainsi que les mutations insérées dans la protéine de capsid n'avaient aucun impact sur la réplication virale. En conclusion, ces données indiquent que chacune de nos trois constructions répliquent leur génome avec la même efficacité. Sur cette base commune, nous pouvions étudier les capacités d'assemblage et de sécrétion de particules de nos trois constructions.

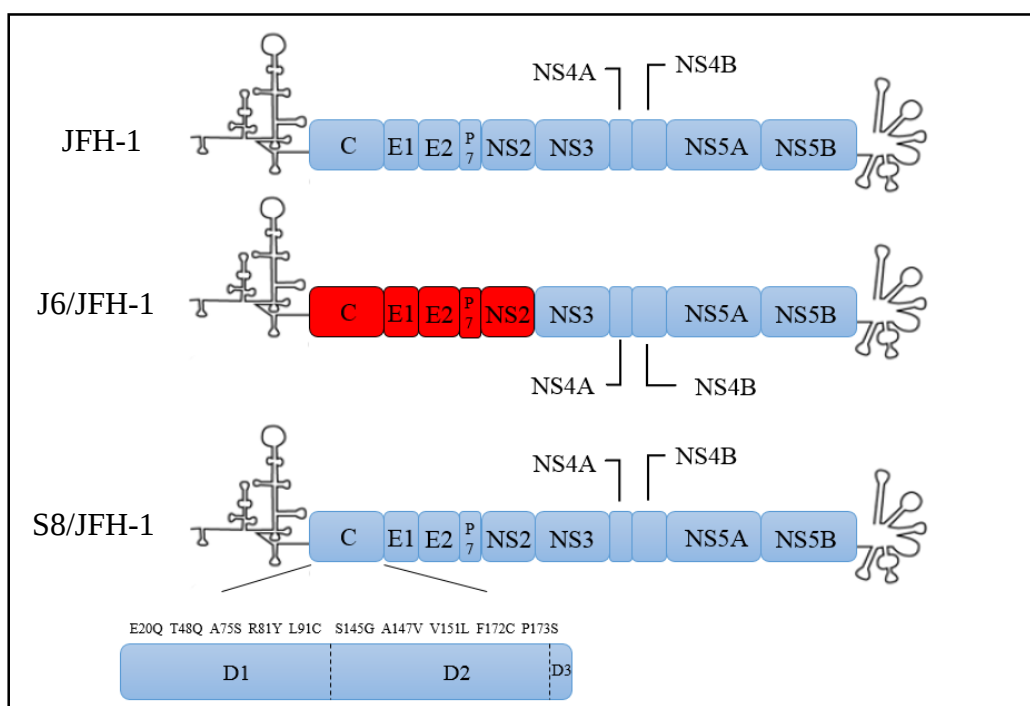


Figure 44. Représentation schématique des ARNs exprimés en cellules Huh 7.5
Les séquences en bleu sont issues du génome JFH-1, les séquences rouges étant celles du génome J6. Les mutations générées pour la création du génome S8/JFH-1 ont été précisées.

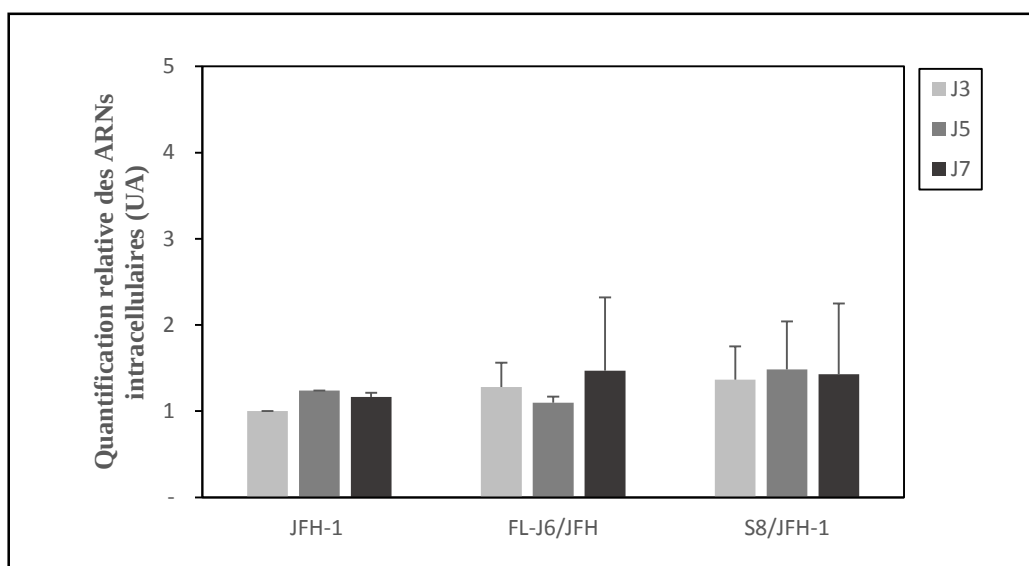


Figure 45. Quantification relative des ARNs intracellulaires

Les données obtenues ont été normalisées par l'expression des gènes de la β -actine et le pourcentage de cellules infectées. La quantité d'ARN JFH-1 Jour 3 a été arbitrairement fixée à la valeur 1

Dans ce but, nous avons tout d'abord quantifié l'ARN présent dans le surnageant des cellules transfectées par chacun des constructions évaluées. Comme cela est visible **Figure 46A**, les transfections par les ARNs de FL-J6/JFH-1 et S8/JFH-1 montrent une augmentation des titres en ARN viral dans les surnageants, en comparaison de ceux obtenus avec le clone JFH-1. Par ailleurs, les titres en ARN viral les plus élevés ont été observées avec les cellules exprimant la construction S8/JFH-1 à J5, avec des valeurs 10 et 50 fois respectivement supérieures à ceux obtenus avec la chimère FL-J6/JFH-1 et le clone JFH-1. Parallèlement à ces résultats, il était intéressant de noter que la quantification de la protéine de capsid dans ces surnageants suivait une dynamique très similaire (**Figure 46B**) avec des concentrations supérieures pour S8/JFH-1 de 1 Log10 et de 2 Log10 par rapport à FL-J6/JFH-1 et JFH-1 respectivement.

Afin de confirmer ces résultats et d'exclure la possibilité de l'impact d'un relargage non spécifique de protéines de capsid et d'ARN, nous avons infecté des cellules naïves Huh 7.5 avec les surnageants de nos différentes cellules transfectées afin de déterminer l'infectivité des trois virus produits. Comme cela est visible **Figure 46C**, les titres infectieux les plus élevés ont été observés pour les surnageants des cellules exprimant la construction S8/JFH-1, déterminés comme étant respectivement 50 à 100 fois supérieurs à FL-J6/JFH-1 et JFH-1 mesurés au jour 5.

Ces résultats confirment ainsi qu'en présence de la construction S8/JFH-1, les dix résidus modifiés de la protéine de capsid ont probablement une incidence majeure dans l'efficacité de production de particules virales infectieuses. De façon assez étonnante, avec cette construction S8/JFH-1, nous avons également constaté que ce virus se propageait très rapidement dans le tapis cellulaire, puisque le pourcentage de cellules infectées, déterminé par la détection de la protéine de capsid en immunofluorescence était proche de 100% dès le jour 5 comparé, ce chiffre n'atteignant que 50/60% pour la chimère FL-J6/JFH-1 et moins de 30% pour JFH-1 (figure 47).

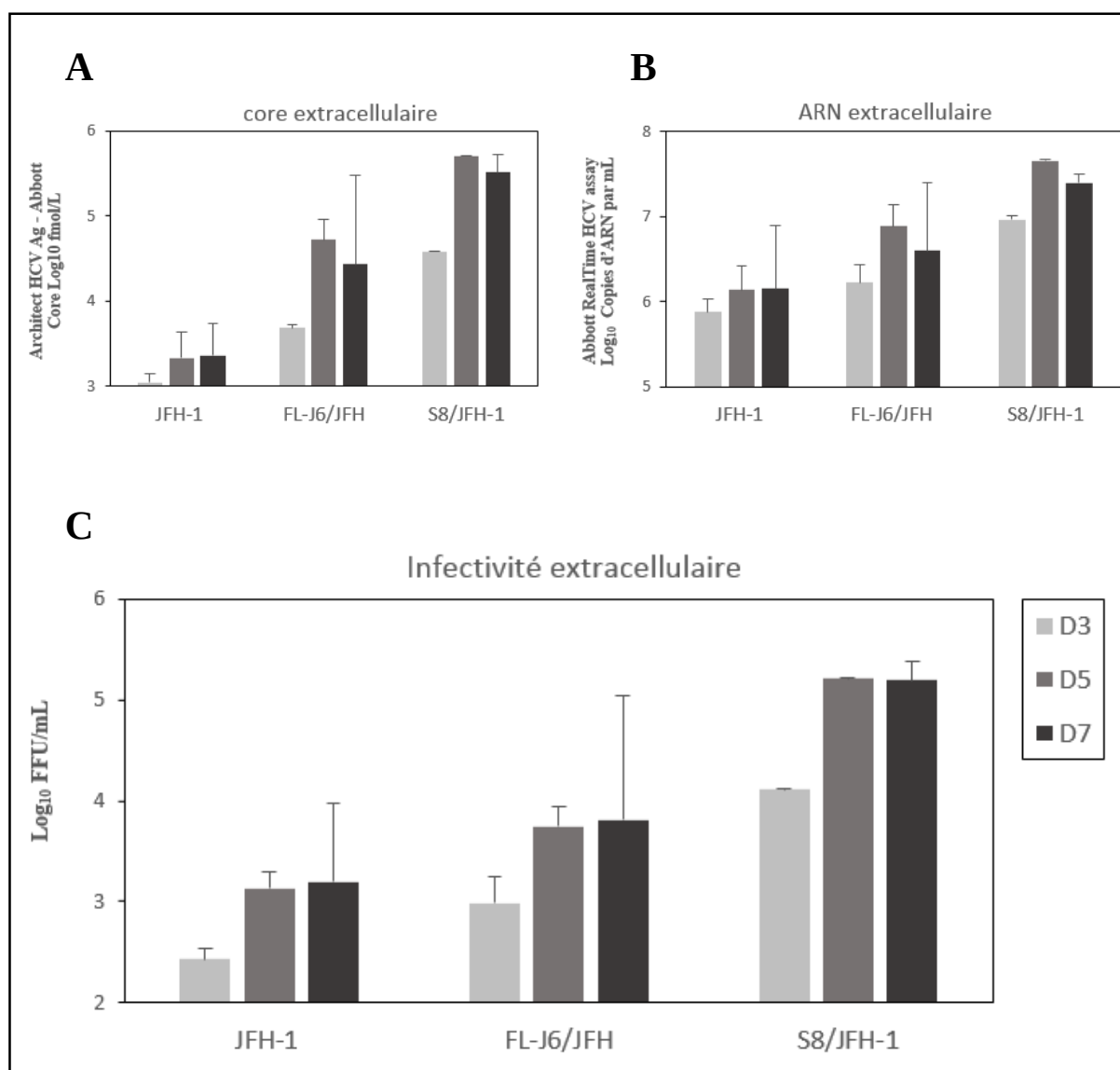


Figure 46. Analyse du surnageant infectieux des cellules exprimant nos 3 ARNs

Les cellules Huh 7.5 ont été transfectées avec 20 µg d'ARN. Les surnageants ont été collectés 3/5 et 7 jours post-transfection. Les résultats sont présentés avec un écart type calculé à partir de trois expériences indépendantes. Pour chaque surnageant, l'ARN (A) et la protéine de capsid (B) ont été dosés. Les titres infectieux ont été déterminés par test d'inféctivité sur cellules naïves et comptage des unités formant colonie (FFU : Focus Forming Units) par millilitre de surnageant (FFU/mL)(C)

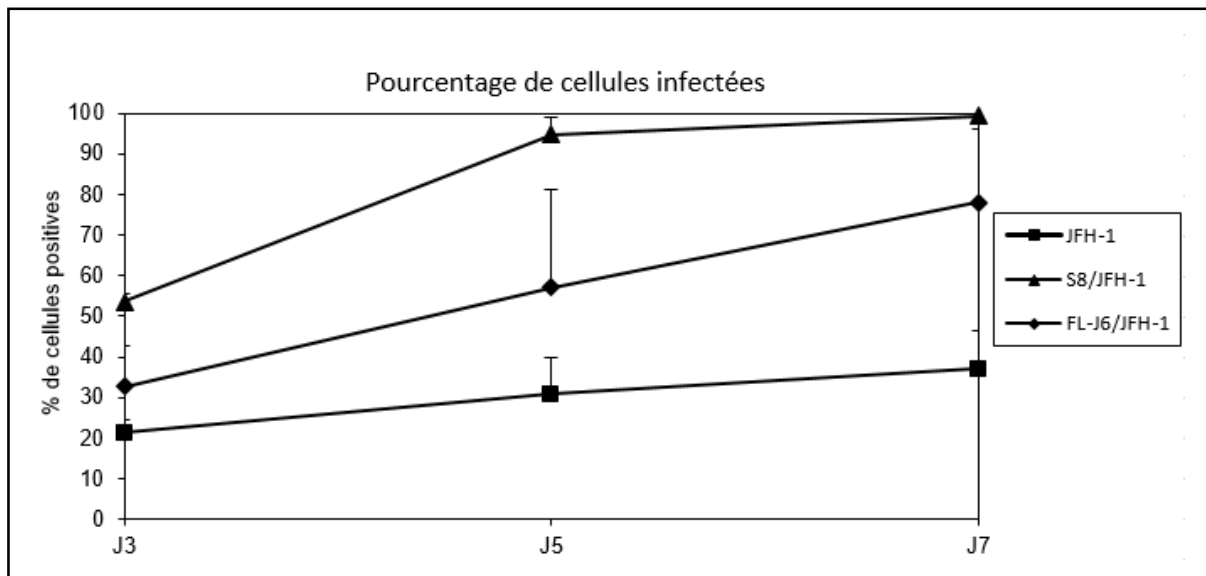


Figure 47. Pourcentage de cellules positives au marquage de la protéine de capside

Parallèlement, nous avons également déterminé l'infectiosité intracellulaire des différentes constructions en infectant des cellules Huh 7.5 à partir de lysats de cellules infectées préalablement lysées par choc osmotique et clarifiés par centrifugation. Trois jours après cette infection nous avons détecté les foyers de cellules exprimant la protéine de capside comme expliqué précédemment. De nouveau, la construction S8/JFH-1 a présenté les titres infectieux intracellulaires les plus élevés, en moyenne 10 et 1000 fois supérieurs à ceux obtenus respectivement pour la chimère FL-J6/JFH-1 et le clone JFH-1 (**Figure 48**). Ceci a permis de montrer que bien que les trois constructions présentent une réplication équivalente, chacune d'entre elles semblent posséder des variations importantes dans les titres infectieux produits, reflétant très probablement des efficacités très différentes dans les capacités d'assemblage et de sécrétion de virus.

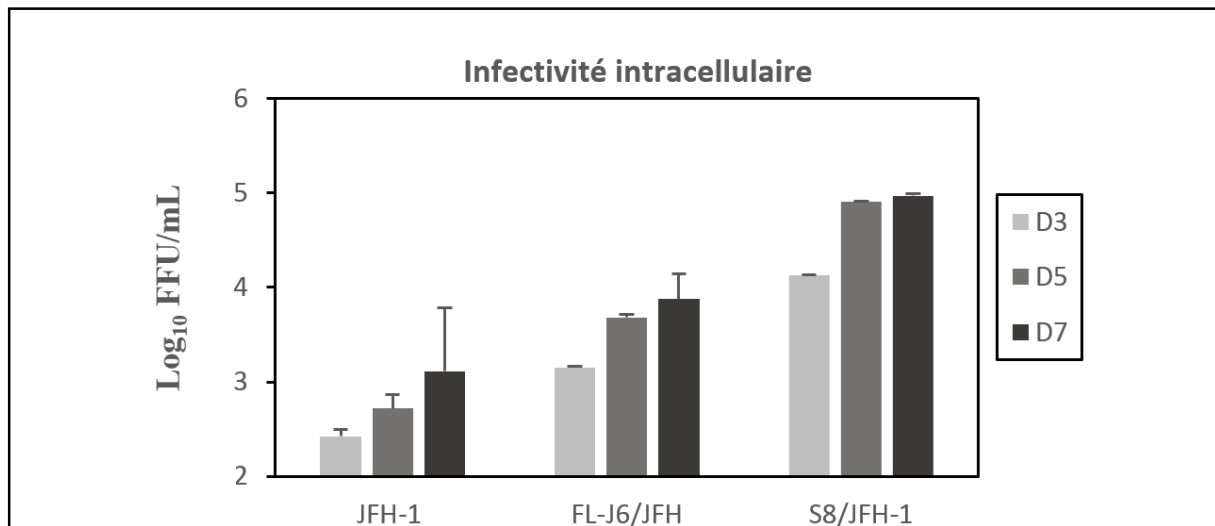


Figure 48. Détermination de l'infectivité intracellulaire

Les cellules infectées ont été lysées par choc osmotique et les lysats obtenus ont été utilisés pour évaluer l'infectivité intracellulaire. Les titres infectieux ont été déterminés par unité formant colonies comme expliqué précédemment. Les résultats ont été normalisés avec le pourcentage de cellules infectées.

En conclusion, et comme il a été démontré dans la littérature (Lindenbach, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006; Shavinskaya *et al.*, 2007) nous avons observé une augmentation de la production de particules virales dans les cellules exprimant la chimère FL-J6/JFH-1 vis-à-vis de JFH-1. Avec la construction S8/JFH-1, nos résultats montrent que la substitution de seulement 10 résidus de la protéine de capsid du génome JFH-1 semble suffisante pour améliorer très significativement la production de particules virales, non seulement par rapport au génome sauvage JFH-1 mais aussi en comparaison de la chimère FL-J6/JFH-1. Compte tenu de ces résultats, la séquence de la protéine de capsid du génome JFH-1 apparaît comme responsable de sa faible production de particules infectieuses, de par des propriétés d'assemblages peu efficaces.

D. Analyse des interactions de la protéine de capsid avec les composants viraux et cellulaires

Après avoir constaté l'impact de la séquence de la protéine de capsid sur la production de particules virales infectieuses, nous avons par la suite étudié par microscopie confocale la

localisation subcellulaire de la protéine de capsid, en lien avec les autres constituants viraux et cellulaires potentiellement impliqués dans la morphogenèse virale.

Dans un premier temps, la colocalisation entre les gouttelettes lipidiques et protéine de capsid a été évaluée. Il s'agit en effet d'une interaction connue dans le cadre d'un génome JFH-1 et démontré comme indispensable à la formation de particules infectieuses (Miyanari *et al.*, 2007). Sans surprise, nous avons observé une forte colocalisation entre la protéine de capsid JFH-1 et les gouttelettes lipidiques marquées au Nile Red retrouvées (**Figure 49A-1**). En revanche, l'observation fine des immunomarquages effectués a montré que seulement 21,5% des gouttelettes lipidiques totales présentaient une colocalisation avec de la protéine de capsid de la chimère FL-J6/JFH-1 (contre 91,5% dans le cadre de JFH-1 ; comptages réalisés sur 20 cellules exprimant la protéine de capsid), des résultats semblables à ceux décrits par Shavinskaya *et al* et Boson *et al.* (**Figure 49A-2**). Concernant les cellules transfectées par S8/JFH-1, seul 4.5% des gouttelettes lipidiques étaient colocalisées avec de la protéine de capsid, avec par ailleurs un signal de fluorescence extrêmement diffus émis par les protéines de capsid immunomarquées au sein de l'ensemble du cytoplasme (**Figure 49A-3**). Bien que l'on observe des différences très marquées entre les trois constructions, la quasi absence d'interaction entre la protéine de capsid S8/JFH-1 et les GL reste difficile à expliquer. En effet, ces expériences avec la construction S8/JFH-1 ne permettent pas de trancher sur l'absence de trafic de la protéine de capsid vers les gouttelettes ou sur la présence effective d'un trafic très furtif, lié aux propriétés particulières d'assemblage des particules virales, comme le suggèrent les résultats précédents (titres infectieux élevés, **Figure 46C et 48**). En effet, l'expression en système SFV de cette protéine de capsid S8/JFH-1 a montré que cette protéine était capable de s'associer aux gouttelettes lipidiques de façon relativement similaire aux autres protéines de capsid étudiées, démontrant ainsi que les 10 mutations présentes dans la protéine de capsid S8/JFH-1 ne perturbaient pas ce phénomène. Néanmoins, l'absence d'assemblage complet et de sécrétion de particules dans ce modèle abortif pourrait expliquer l'accumulation de protéine de capsid à la périphérie des gouttelettes lipidiques. En revanche, les résultats obtenus avec les constructions FL-J6/JFH-1 et S8/JFH-1 en modèle VHCcc montrent qu'un assemblage efficace des particules infectieuses affecte directement le trafic des protéines de capsid à la surface gouttelettes lipidiques. Cette observation est d'autant plus notable dans le cas de S8/JFH-1 dont la protéine de capsid possède une distribution homogène au sein du cytoplasme suggérant une association privilégiée avec les membranes du RE. Ceci est à mettre en opposition avec les

profils observés dans les cellules répliquant les génomes FL-J6/JFH-1 et surtout JFH-1 où les protéines de capsid forment des agrégats facilement détectables en immunofluorescence.

Le rôle avéré de la protéine NS5A dans l'assemblage de particules ainsi que sa localisation à la surface des gouttelettes lipidiques ayant été démontrés (Appel *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2002), nous avons ensuite étudié d'une part les localisations subcellulaires de nos différentes protéines de capsid avec la protéine NS5A (**Figure 49b**), et d'autre part la localisation à la surface des gouttelettes lipidiques de la protéine NS5A (**Figure 49C**). Globalement, ces deux conditions nous ont apporté des informations intéressantes et en adéquations avec les résultats observés pour la protéine de capsid. Comme attendu, l'observation des cellules exprimant le génome JFH-1 a révélé une quasi superposition du signal de fluorescence de NS5A avec celui de la protéine de capsid (**Figure 49B-1**) ou celui des gouttelettes lipidiques (**Figure 49C-1**). Bien que nous ayons obtenu des résultats similaires avec la chimère FL-J6/JFH-1 et la construction S8/JFH-1 montrant une forte colocalisation entre NS5A et les protéines de capsides (**Figure 49B-2 et 49B-3**), la protéine NS5A n'était systématiquement non retrouvée à la surface des gouttelettes lipidiques pour ces deux constructions (**Figure 49C-2 et 49C-3**). Ces résultats suggèrent ainsi que protéine de capsid et protéine NS5A sont majoritairement présentes dans des localisations cellulaires distinctes des gouttelettes lipidiques, probablement constituées par les membranes du réticulum endoplasmique. Par ailleurs, nos résultats semblent démontrer que la variabilité de localisation subcellulaire de la protéine NS5A est sous la dépendance de celle observée pour la protéine de capsid.

Enfin, ces résultats soulignent l'importance de la nature des acides aminés de la protéine de capsid dans sa localisation subcellulaire, et potentiellement par extension dans la localisation du site d'assemblage viral. De façon surprenante, les hauts titres infectieux obtenus avec S8/JFH-1 et dans une moindre mesure FL-J6/JFH-1 ne sont pas associés à une meilleure interaction de la protéine de capsid à la surface des gouttelettes lipidiques.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons étudié la localisation de la protéine de capsid et de E2 en microscopie confocale, E2 constituant par ailleurs un excellent marqueur des membranes du RE. Les résultats obtenus ont de nouveau été très différents selon que l'on observait les cellules exprimant le génome JFH-1, la chimère FL-J6/JFH-1 ou la construction S8/JFH-1 d'autre part (**Figure 49D-1 à D-3**). Pour le clone JFH-1, la grande majorité des protéines de capsid et des glycoprotéines E2 n'étaient pas colocalisées, seuls quelques patches combinant core et E2 étaient détectés, probablement dans des zones de contact étroit entre les

gouttelettes lipidiques et les membranes du RE. En revanche, au sein des cellules exprimant FL-J6/JFH-1 et, de façon encore plus nette pour la construction S8/JFH-1, une colocalisation importante a été observée entre la protéine de capsid et E2 a été observée, dans des régions cellulaires correspondant très probablement aux membranes du réticulum endoplasmique, du fait de l'ancrage de E2 dans ce compartiment. En l'absence d'une étude ultrastructurale en microscopie électronique ayant permis de visualiser précisément l'assemblage de particules virales, ces résultats suggèrent l'ensemble des phases de la morphogénèse virale pourrait être réalisées à proximité des membranes du réticulum endoplasmique, avec potentiellement une implication limitée des gouttelettes lipidiques, notamment dans le cas de la chimère FL-J6/JFH-1 et de la construction S8/JFH-1.

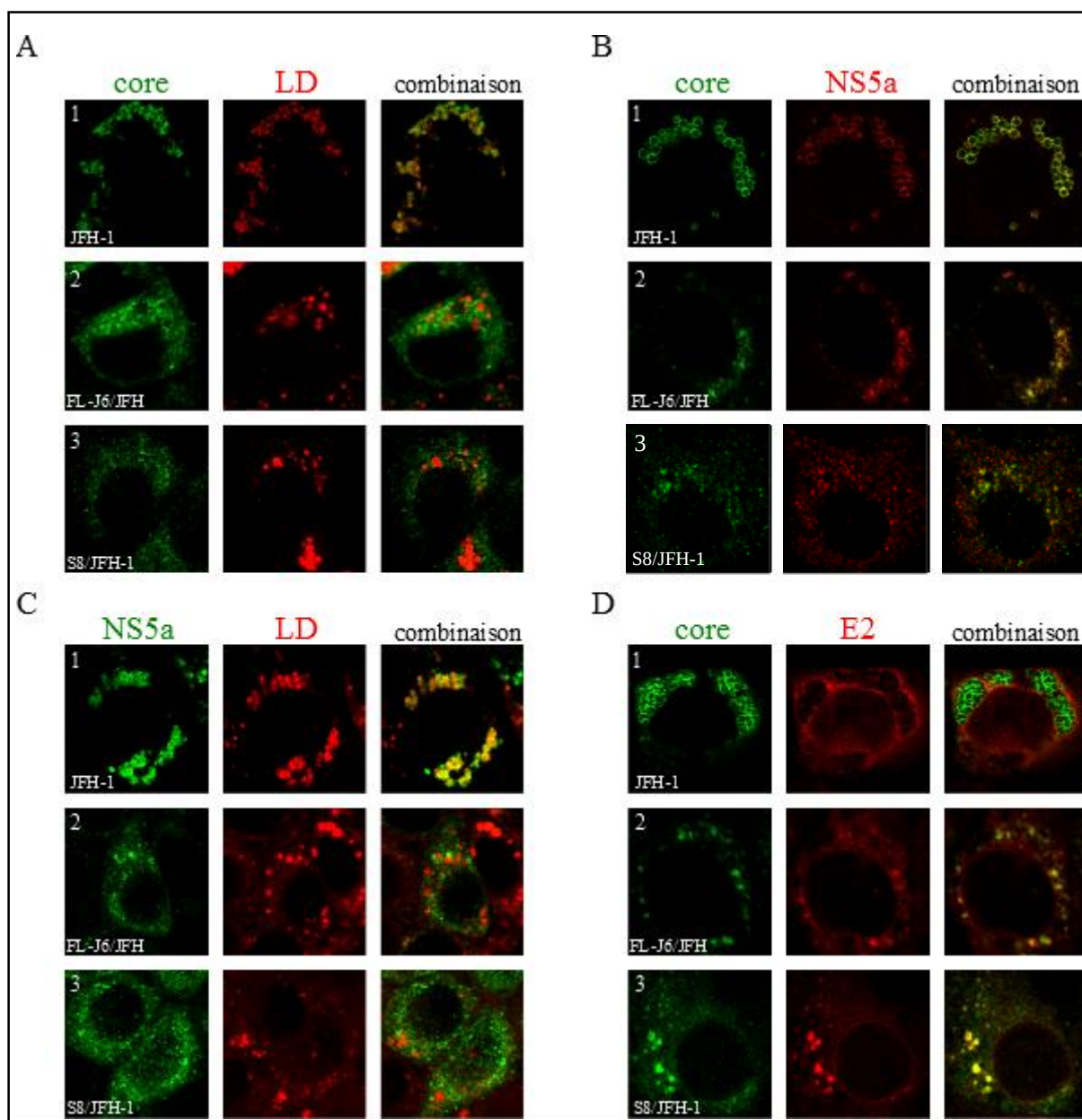


Figure 49: Localisation subcellulaire de protéines virales au sein de cellules Huh 7.5 exprimant les constructions JFH-1, FL-J6/JFH-1 et S8/JFH-1

Des cellules Huh 7.5 ont été transfectées avec les ARNs des génomes entiers JFH-1, FL-J6/JFH-1 ou S8/JFH-1, fixées 6 jours post-transfection et marquées pour la révélation des GL, de la protéine de capsid, E2 ou NS5A. **(A)** La protéine de capsid a été immunomarkuée à l'aide de l'anticorps monoclonal C7-50, les GL sont révélés à l'aide du Nile Red. **(B)** La protéine de capsid et la protéine NS5A ont été respectivement marquées par l'anticorps C7-50 et un anticorps polyclonal anti-NS5A. **(C)** Immunomarkuages de la protéine de capsid et de NS5A. **(D)** Immunomarkuages de la protéine de capsid et de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (révélée par l'anticorps AR3A).

Ce projet fera très prochainement l'objet d'une publication soumise au journal « *Journal Of Virology* ».

Discussion

IV. Discussion

La découverte, en 2005, du clone JFH-1 de génotype 2a par Wakita et al. (Wakita *et al.* 2005), unique clone capable de réaliser un cycle viral complet, a permis une étude plus approfondie de la morphogénèse virale. En effet, même si peu de données sont disponibles actuellement sur les phases impliquées dans l'assemblage viral, ou sur la nature et la structure exacte du virus, plusieurs travaux récents ont montré que la production de particules virales sous la dépendance des protéines structurales du virus était également dépendante de l'intervention de protéines telles que p7, NS2, NS3 ou NS5A (Appel *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2007, 2011; Popescu *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes intimes de la morphogénèse virale, incluant un réseau complexe d'interactions protéines-protéines, restent un domaine largement méconnu du cycle viral, même si l'on sait aujourd'hui que l'intervention des membranes du RE et des gouttelettes lipidiques sont probablement essentiels en constituant un environnement cellulaire favorable à ces interactions (Boson *et al.*, 2011; Boulant *et al.*, 2007; Popescu & Dubuisson, 2010). Dans ce contexte, les travaux antérieurs de l'équipe sur la protéine de capsid (élément moteur de l'assemblage viral) ont montré qu'une séquence de protéine de capsid de génotype I (séquence Dj), exprimé en système de surexpression dérivé du SFV, présentait la capacité de s'autoassembler pour former des pseudoparticules virales bourgeonnant de façon incomplète à partir de membranes du réticulum endoplasmique (Blanchard *et al.*, 2003; Hourieux *et al.*, 2007). Dans le cadre de ces travaux de thèse, en utilisant de nouveaux les vecteurs SFV, nous avons constaté que la protéine de capsid de la souche JFH-1 ne conduisait pas à la formation de VLPs, malgré des propriétés globalement préservées pour cette séquence (adressage de la protéine aux membranes du RE, interaction avec les gouttelettes lipidiques préservée (**Figures 25-27**, pages 100-104). Ces résultats, bien qu'obtenus dans un système relativement artificiel (vecteur SFV) ne modélisant pas toutes les étapes du cycle viral, apportent néanmoins des éléments intéressants sur les propriétés intrinsèques amoindries de la protéine de capsid du clone JFH-1, et finalement corroborent les données obtenues avec les génomes chimères de JFH-1, en particulier la chimère Jc1 (Pietschmann *et al.*, 2006; Shavinskaya *et al.*, 2007). Par ailleurs, plusieurs travaux s'intéressant à la cartographie structure/fonction de la protéine de capsid ont montré qu'il était difficile de modifier par mutagenèse dirigée cette protéine de capsid, sans altérer profondément ses propriétés, conduisant bien souvent à des effets très délétères notamment sur l'assemblage et la sécrétion de particules virales et de ce fait rendant

difficile l'étude des phases tardives du cycle du VHC (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007). Une des raisons de ces difficultés réside probablement dans le fait que la protéine de capsid constitue une des protéines les plus conservées au sein du VHC. Dans le but de contourner ces difficultés techniques, les projets développés au cours de cette thèse ont consisté tout d'abord à élaborer un génome JFH-1 bicistronique, dont la structure basée sur les « génomes luciférase » (Wakita *et al.*, 2005) était capable d'exprimer deux copies de protéines de capsides, associant la séquence d'une protéine de capsid non modifiée, et une seconde dotée de tags fluorescents permettant une étude potentiellement dynamique de la localisation de la protéine *in vitro*. L'idée générale ayant guidé cette stratégie était que la présence de tags même de courte longueur était susceptible d'altérer partiellement les propriétés de la protéine de capsid, mais que la présence d'une protéine de capsid sauvage pourrait suppléer et restaurer des fonctions perdues par la forme mutée. En outre, nous espérions par co-assemblage de ces deux copies de protéine de capsid pouvoir générer des particules virales infectieuses modifiées avec la perspective de développer un modèle permettant leur étude dans les mécanismes de l'entrée et de la post-entrée, à l'aide des tags introduits dans la nucléocapsid. Bien que 5 constructions aient été élaborées, avec un choix judicieux d'insertion des tags GFP et FlAsH/ReAsH, leur expression en système SFV a montré, des effets plus ou moins délétères sur la localisation intracellulaire de ces protéines. En particulier, comme attendu, ces premières études montrent que le tag GFP, présente une taille bien trop élevée pour pouvoir être raisonnablement utilisé dans notre approche de génome bicistronique pour la protéine de capsid. Enfin, pour les constructions possédant un tag entre le domaine II et III de la protéine de capsid, nous n'avons pas évalué la conservation du site de clivage par la SPP, une étape qui aurait été indispensable à la vue des publications ayant montré que ce clivage était indispensable pour générer la protéine mature de capsid retrouvée dans le virion infectieux (Ait-Goughoulte, 2006; Targett-Adams *et al.*, 2008). Dans leur ensemble, ces différents résultats soulignent les difficultés d'étude de la protéine de capsid, puisque même la présence d'un tag de taille restreinte comme FlAsH/ReAsH est susceptible de fortement modifier les propriétés de la protéine, même si certaines constructions, comme « FlAsH/ReAsH en Del1 » et « FlAsH/ReAsH en Nterm » (**Figures 25-27**, pages 100-104), montrent qu'elles ont conservées leurs propriétés d'adressage au RE, et de co-localisation avec les gouttelettes lipidiques. Au début de ce projet, les travaux publiés sur la morphogenèse visaient à élaborer des génomes JFH-1 défectifs pour l'expression de certaines protéines virales, ces dernières étant ensuite produite par trans-complémentation (Sugiyama *et al.*, 2009). Ces approches ont

notamment été évaluées et validées pour la protéine de capsid, la protéine NS2 et la protéine NS5A, mais cependant les titres viraux obtenus avec ces stratégies restaient bien inférieurs à ceux obtenus dans le cadre de la réplication d'un clone JFH-1 sauvage. Notre approche originale de génome bicistronique aurait pu permettre de pallier ces difficultés, cependant, l'expression, en cellules Huh 7.5, de ce génome bicistronique possédant deux versions de la protéine de capsid sauvage a rapidement montré qu'il ne permettait pas le développement et l'installation d'un cycle viral productif. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène, comme par exemple une toxicité élevée en raison de la synthèse plus élevée de la protéine de capsid dans les cellules transfectées. D'autre part, on ne peut exclure une inefficience de la réplication et/ou de sa traduction de ce génome modifié, bien que sa construction ait largement copié les stratégies développées pour l'élaboration des génomes portant la luciférase comme gène rapporteur (Wakita *et al.*, 2005). Ces résultats peu encourageants, liés aux objectifs probablement trop ambitieux et incertains de ce type d'approches nous ont conduits à rapidement abandonner ce projet. Cependant, des travaux récents ont par la suite montré qu'il était possible de modifier la protéine de capsid en introduisant dans son extrémité N-terminale un tag FAsH/ReAsH dans le contexte d'un clone JFH-1, en ayant recourt finalement à un génome peu modifié et de ce fait effectivement réplcatif (Counihan *et al.*). Cette construction a notamment permis d'étudier la localisation subcellulaire de la protéine de capsid en temps réel, et mis en évidence un trafic de la protéine de capsid le long des microtubules après avoir quitté la surface des gouttelettes lipidiques, suggérant la transport des particules virales en cours de maturation au sein de vésicules, après leur passage dans le RE (Counihan *et al.*, 2011). Par la suite, dans un projet non décrit dans ce document, nous avons cherché à élaborer des stratégies nouvelles, dont l'utilisation du tag miniSOG, un peptide de 106 aa de longueur (Shu *et al.*, 2011), inséré en un ou deux exemplaires au sein du domaine HVR1 de E2. Cependant, la fluorescence de ce tag s'avère être d'une très faible intensité, indépendamment des perturbations qu'il est susceptible d'engendrer sur la fonctionnalité des protéines ainsi taguées.

Dans le deuxième projet développé au cours de cette thèse, l'objectif initial du projet « ARN négatif » était de rechercher dans les séquences de VHC complètes (disponibles dans la base de Los Alamos), la présence potentielle d'ORFs présents sur l'ARN négatif du virus. Bien que le rôle communément admis de cet ARN consiste à fournir une matrice pour la réplication du génome du virus sous forme d'un ARN positif, jusqu'à présent aucune donnée bibliographique n'a évoqué d'autres fonctions pour cet acide nucléique. L'idée d'analyser la présence potentielle d'ORFs sur l'ARN négatif est liée à plusieurs constats concernant le clone JFH-1,

le dénominateur commun actuel de la recherche sur le VHC. En effet, cette séquence possède des spécificités tout à fait singulières, du fait qu'elle constitue actuellement la seule souche de VHC à pouvoir être propagée *in vitro*, parmi les nombreuses séquences complètes de VHC clonées et évaluées depuis la découverte du virus en 1989 et jusqu'à aujourd'hui. De même, les conditions dans lesquelles cette souche a été obtenue sont tout à fait particulières, puisque ce génome a été isolé à partir d'un patient ayant développé une hépatite fulminante, un événement rare dans le cas du VHC. Enfin, les premières expériences réalisées sur un réplicon sous génomique de ce virus (un génome réplcatif dépourvu de la partie codant les protéines structurales) montraient une capacité de réplcation *in vitro* très élevée comparativement à d'autres réplicons sous génomiques disponibles (Kato *et al.*, 2003). Ceci souligne probablement l'importance des séquences codant les protéines non structurales contenant probablement des propriétés de réplcation particulières expliquant l'aptitude du JFH-1 à se réplquer *in vitro*. Ceci a été confirmé plus tard avec l'élaboration par biologie moléculaire de nombreux génomes chimères, dans lesquels les protéines structurales peuvent être remplacées par leurs homologues issues d'autres génotypes (Gottwein *et al.*, 2011; Mateu *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données suggèrent que les caractères singuliers de ce clone JFH-1 pourraient être liés à des spécificités présentes dans la séquence codant les protéines non structurales allant de NS2 à NS5B. Cependant, malgré une littérature abondante consacrée à l'analyse de ces protéines non structurales ou à la séquence ARN codant ces protéines, aucun élément n'a été jusqu'à présent identifié pour expliquer de telles propriétés. Dans ce projet, l'analyse des propriétés de l'ARN négatif nous a semblé constituer une approche intéressante, puisque cela n'a jamais été envisagé de façon approfondie pour le VHC ou pour d'autres virus à ARN de polarité positive. Une première analyse sommaire de l'ARN négatif du clone JFH-1 a rapidement permis d'identifier 4 ORFs majeurs (de longueurs supérieure à 90 aa), dont 3 d'entre eux étaient présents en regard des séquences codant les protéines non structurales (ORF1, ORF2, ORF3). Parmi eux, l'ORF2 a rapidement concentré notre intérêt en raison de sa longueur particulièrement importante (312 aa), et de ce fait a été identifiée comme tout à fait unique pour le clone JFH-1 après réalisation d'alignements avec d'autres séquences de référence de VHC. Les rôles potentiels de cet ORF2 ont été étudiés au laboratoire sous deux volets distincts, l'un comprenant l'étude *in vitro* de l'impact de cet ORF2 sur la propagation du virus en culture cellulaire, et un projet consistant à rechercher la présence d'anticorps potentiellement dirigés contre ces ORFs dans une population de patients infectés par des virus de génotype 1 et 2. Une première recherche *in silico* à large échelle sur l'ensemble des génotypes de VHC a permis dans un premier temps de confirmer la

longueur tout à fait unique pour l'ORF2 de JFH-1. Par la suite, cette analyse bio-informatique s'est concentrée sur les séquences de génotype 1 et 2. Ceci a permis de montrer de manière surprenante que la quasi-totalité des séquences des génotypes 1 et 2, possédaient des cadres de lecture ouverts (ORF_c/ORF2a-1, ORF2a-2 et l'ORF-2B) très conservés (séquence protéique), en phase avec l'ORF2, mais cependant de plus petite taille. Ces analyses ont également permis de montrer que l'ORF1 du clone JFH-1 situé en regard avec les protéines NS5A et NS4B, était absent dans les séquences de même génotype (2a). De façon surprenante, un homologue fidèle de cet ORF est retrouvé dans la totalité des séquences de génotype 2b (ORF1-2b). Ceci soulève le problème de la classification correcte du sous type du clone JFH-1, ou pourrait révéler une éventuelle chimérisation de ce génome entre séquences des génotypes 2a et 2b. Après cette analyse de séquences, et la mise au point d'un test de screening des anticorps dirigés contre les protéines codées par les ORF2 et ORF « c », l'analyse de sérums de patients infectés n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre l'une ou l'autre de ces protéines. Ces résultats négatifs ont été obtenus chez tous les patients infectés quel que soit les critères de sélection des sérums (bilan de prétraitement, patient transplanté). Un groupe constitué de patients présentant des scores de fibrose hépatique avancée liée au VHC a pu également être évalué pour compléter ces résultats. De même, il pourrait être pertinent d'évaluer des cas atypiques d'infection à VHC, comme par exemple des cas d'infections chroniques particulièrement agressives ou d'infections fulminantes ; cependant ces cas se révèlent particulièrement rares. Bien que l'hypothèse la plus probable pour les résultats négatifs obtenus soit l'absence effective dans les sérums d'anticorps dirigés contre les protéines codées par ORF2 et ORF « c », on ne peut exclure le cas d'une non détection de ces anticorps pouvant être liée à l'orientation de la protéine lors de l'immunocapture dans la plaque ELISA. En effet, en raison de problèmes d'initiation multiple de la traduction au sein de notre vecteur d'expression dérivé du virus de la forêt Semliki, seules des protéines dont le tag FLAG était localisé en position N-terminale ont pu être utilisées dans notre ELISA de type sandwich. Il n'est donc pas exclu que cette configuration ne soit pas optimale pour la détection des anticorps potentiellement présents dans le sérum de patients VHC +. Afin de résoudre les difficultés évoquées ci-dessus, il pourrait être envisagé de changer de système d'expression pour palier le risque d'initiation sur plusieurs codons d'initiation au cours de la traduction des protéines possédant le tag FLAG en position C-terminal. Sur un autre plan, une des perspectives de ce travail pourrait également consister à analyser dans notre test des sérums de chimpanzés infectés par la souche JFH-1, ce qui pourrait permettre d'évaluer la traduction effective de

l'ORF2 au cours du cycle viral *in vivo* (Saeed *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2014). Par ailleurs, une étude *in vitro* du rôle potentiel de l'ORF2 de JFH-1 a été réalisée. La stratégie a consisté en l'inactivation partielle ou totale cet ORF au sein du clone JFH-1 en introduisant des codons stop tout au long de la séquence codant cet ORF, et d'évaluer les capacités répliquatives de tels virus. Après plusieurs expériences de transfections en cellules Huh 7.5, les mutations introduites n'ont pas eu d'incidence notable sur les capacités répliquatives de ce génome modifié par comparaison avec la souche JFH-1 parentale. Finalement, l'ensemble de ces résultats semble indiquer que cet ORF2 de la souche JFH-1, bien que de longueur tout à fait singulière et inusuelle, ne serait présente que de façon complètement fortuite. De même, si l'ensemble des ORFs détectés et conservés dans les séquences de VHC n'a pas été évalué, les résultats négatifs obtenus au cours de ce projet ne sont pas de nature à encourager leur étude, nécessitant des approches techniques variées et finalement relativement complexes.

Bien que les premières études du génome JFH-1 aient montré que ce clone particulier n'a pas besoin de mutations adaptatives pour infecter et se répliquer dans les cellules Huh 7 (Wakita *et al.*, 2005), la production de particules infectieuses se produit à un niveau relativement faible en l'absence de modifications de sa séquence codante. Parmi ces stratégies de modifications, la conception des génomes chimères a rapidement émergé comme une stratégie visant à accroître les titres viraux, comme on l'observe avec les génomes FL-J6/JFH-1 et Jc1 constitués de la séquence de JFH-1 dont les séquences codant la protéine de capsid jusqu'à la protéine NS2 complète (FL-J6/JFH-1) ou partielle (Jc1) sont remplacées par celles de la souche J6 (Lindenbach, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006). Les connaissances acquises par l'étude de cette chimère suggèrent fortement que les protéines structurales, mais aussi le peptide p7 et la partie N-terminale de NS2 sont impliqués dans la morphogénèse du VHC et contribuent au niveau de production du virus (Boson *et al.*, 2011; Gentzsch *et al.*, 2013). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'assemblage viral restent largement méconnus, même si de nombreux indices tendent à penser que la protéine de capsid de JFH-1 pourrait être déficiente et donc impliquée dans les faibles titres viraux sécrétés par la souche JFH-1 (Boson *et al.*, 2011; Shavinskaya *et al.*, 2007). La protéine de capsid est connue comme étant une protéine hautement conservée à travers les différents génotypes du VHC (l'analyse de nos différentes séquences a révélé plus de 90% de conservation des 180 résidus). Dans le cadre du troisième projet de cette thèse, l'objectif a consisté à évaluer l'impact de la séquence de la protéine de

capside JFH-1 dans ses propriétés fonctionnelles. Les alignements de 1066 séquences de protéines de capsid ont révélé que la séquence de la protéine de capsid JFH-1 était globalement conservée, à l'exception de dix résidus, retrouvés parmi les autres séquences de génotype 2 avec une fréquence moyenne (Leu 91), basse (Thr 48, Ser 145) voir très basse (Glu 20, Ala 75, Arg 81, Ala 147, Phe 172 et Pro 173). Au sein de ces derniers résidus, 4 d'entre eux (20 Glu, Arg 81, Ser 145 et F 172) n'ont jamais été retrouvés dans les autres 1013 séquences (autres génotypes, génotype 2 exclu), et deux d'entre eux l'étaient avec une fréquence $\leq 2,1\%$ (Thr 48 et Pro 173). Ces dix résidus particuliers sont équitablement répartis entre le domaine 1 et 2, mais absent du domaine 3. Selon des études antérieures, Glu20 se situerait dans le domaine de liaison à l'ARN (Sharma *et al.*, 2012), les résidus en positions 75, 81 et 91 font partie du domaine putatif d'homodimérisation et d'interaction avec la protéine E1 (Boulant *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 1996), trois résidus (Ser 145, 151, Ala 147) étant présents dans le domaine 2, structuré de deux α -hélices et permettant l'ancrage de la protéine dans les membranes du RE et l'association aux gouttelettes lipidiques. Les derniers résidus Phe172 et Pro173 semblent intervenir directement dans la production virale, leur remplacement par les résidus Cys172 et Ser173 dans la souche JFH-1 ayant montré une augmentation des titres infectieux sans rupture de l'adressage des protéines de capsid aux gouttelettes lipidiques (Delgrange *et al.*, 2007) Le système d'expression SFV, auparavant présenté comme un outil utile pour l'étude de l'assemblage de la protéine de capsid et de son association avec les gouttelettes lipidiques (Hourieux *et al.*, 2007; Roingeard & Hourieux, 2007), a ensuite été utilisé pour évaluer les propriétés de la protéine de capsid JFH-1 en comparaison d'une protéine de capsid de génotype I précédemment décrite comme compétente pour la formation de VLP. A notre grande surprise, les études en microscopie électronique ont révélé que la protéine de capsid JFH-1 n'était pas en mesure de s'auto-assembler en VLP malgré sa détection à la surface des GL et au niveau des membranes du RE, illustrant l'hypothèse de propriétés d'assemblage partiellement déficientes soulevée par plusieurs études en modèle HCVcc (Boson *et al.*, 2011; Counihan *et al.*, 2011; Shavinskaya *et al.*, 2007). Dans un premier temps, nous avons d'abord décidé de remplacer un à un chacun des dix résidus singuliers identifiés dans la protéine de capsid JFH-1 pour évaluer leurs rôles respectifs dans la morphogénèse virale. A l'aide du système SVF, cette stratégie a cependant échoué à identifier ponctuellement les acides aminés susceptibles de restaurer la formation de VLP, bien que tous les mutants présentaient des capacités conservées d'association aux GL et aux membranes du RE, associé à un clivage par la SPP efficace (données non présentées). Par la suite, nous avons généré la protéine de capsid S8/JFH-1

constituée du squelette JFH-1, dans lequel les dix résidus ont été remplacés par les résidus les plus fréquemment retrouvés dans les séquences consensus de génotype I et II. De manière surprenante, l'étude de ce mutant à la fois dans le système d'expression SFV et dans le contexte de la souche JFH-1 entière a présenté des propriétés de multimérisation et d'assemblage bien supérieures à la séquence JFH-1 parentale et finalement plus proches de celles de la chimère FL-J6/JFH-1. La première illustration de cette observation, a été révélée dans les expériences d'expression en système SFV, montrant que la mutation des dix résidus permettait de restaurer les propriétés de multimérisation de la protéine (**Figure 42C**, page 135). De même, en système VHCcc, des titres élevés de virus infectieux ont été mesurés dans les surnageants de cellules répliquant le génome chimère S8/JFH-1. Ces titres élevés ont été observés sans une augmentation globale de la réplication de l'ARN viral puisque nous avons observé des niveaux de réplication similaires pour toutes les constructions de VHC testés dans cette étude. En outre, nous avons constaté que près de 100% des cellules étaient infectés au jour 5, une caractéristique jamais observé pour JFH-1 ni pour la chimère FL-J6/JFH-1 dans nos expériences, ou dans les données de la littérature récente consacrée au même sujet (Boson *et al.*, 2011). De même, l'évaluation de l'infectiosité intrinsèque des particules virales n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les particules virales produites par les trois constructions, il reste difficile d'affirmer si la propagation augmentée de la construction S8/JFH-1 est à mettre en relation avec les titres viraux élevés observés ou avec une meilleure aptitude de la construction S8/JFH-1 à initier et entretenir une réplication virale dans une cellule après infection de celle-ci. Bien que nous n'ayons pas d'arguments probants pour l'une ou l'autre de ces hypothèses, nous penchons en faveur d'un meilleur « fitness » de la construction S8/JFH-1 en cellules Huh 7.5, une étude récente ayant montré l'impossibilité d'obtenir 100% de cellules infectées dans des cultures au long cours (49 jours) de cellules infectées par JFH-1, ou par Jc1, une chimère permettant pourtant l'obtention de titres viraux élevés (Boson *et al.*, 2011).

Peu de temps après leur synthèse au niveau des membranes du RE, les protéines de capsid du VHC s'accumulent à la surface des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par JFH-1 (Rouille *et al.*, 2006; Miyanari *et al.*, 2007; Boulant *et al.*, 2007; Targett-Adams *et al.*, 2008). Il a été proposé que les gouttelettes lipidiques pourraient induire une forte concentration de protéine de capsid à proximité des membranes du RE, créant ainsi un environnement favorable permettant le recrutement de l'ARN viral et l'assemblage de la nucléocapsid (Miyanari *et al.*, 2007). Ce modèle permettrait aux gouttelettes lipidiques cellulaires de constituer des plateformes facilitant la concentration locale de composants viraux pour initier l'assemblage, telle la

protéine de capsid, ou la protéine NS5A qui effectueraient le lien entre la réplication du VHC et la voie d'assemblage (Gawlik *et al.*, 2014; Masaki *et al.*, 2008). Par la suite, l'enveloppement de la particule aurait lieu au niveau des membranes du RE où les glycoprotéines d'enveloppe sont ancrées, aboutissant à la sortie des virus avec les produits de synthèse des VLDL via la voie de sécrétion naturelle de la cellule (Coller *et al.*, 2012; Counihan *et al.*, 2011; Popescu & Dubuisson, 2010). Cependant, plusieurs interrogations persistent concernant ce modèle, la plus importante est sans doute la question du mécanisme permettant la dissociation de la protéine de capsid de la surface des gouttelettes lipidiques et sa relocalisation sur le côté cytosolique de la membrane du RE. L'expression de nos trois constructions révèle que la présence de la protéine de capsid en surface des gouttelettes lipidiques diminue proportionnellement avec l'augmentation des titres infectieux observés dans les surnageants. Cela est d'autant plus flagrant avec la S8/JFH-1, la protéine de capsid étant apparemment (à la résolution et sensibilité du microscope confocal) presque complètement absente de la surface des gouttelettes lipidiques. En outre, la protéine de capsid semble dans cette construction avoir une localisation majoritairement réticulaire, comme le montre les images obtenues en microscopie confocale permettant de visualiser une co-localisation importante avec la protéine E2 (**Figure 49D**, page 146). Ce phénomène, bien que peut-être moins marqué a été décrit précédemment dans des cellules transfectées par la chimère Jc1 (Shavinskaya *et al.*, 2007). Dans cette étude, la présence réduite de protéines de capsid à la surface des gouttelettes lipidiques avait été interprété comme résultant d'un trafic rapide de la protéine entre les gouttelettes lipidiques et les membranes du RE, en liaison avec de meilleures propriétés d'assemblage de la protéine de capsid J6. Dans notre cas, les résultats obtenus avec S8/JFH-1 suggèrent que la protéine de capsid ne parvient pas à la surface des gouttelettes lipidiques, et pourrait être incorporée dans les particules naissantes dans un temps très court après sa synthèse. Les premiers arguments qui soutiennent cette hypothèse proviennent de nos expériences en système SFV. Dans ces expériences, l'expression de protéines de capsid JFH-1 montre que cette protéine, bien que présente sur la membrane du RE, n'est jamais associée à la formation de VLP. Ceci suggère que la séquence spécifique de la protéine de capsid JFH-1 est probablement déficiente dans ses capacités d'homodimérisation. Au contraire, la protéine de capsid mutée S8/JFH-1 présente des propriétés de multimérisation élevées, ce qui pourrait expliquer que son recrutement pour l'assemblage viral soit rapide, malgré sa capacité à interagir avec les gouttelettes lipidiques. Il pourrait être possible que dans le cas d'une infection par le génome JFH-1, que cette incapacité à multimériser, conduise à l'accumulation de protéine de capsid à la membrane du RE, et puisse

agir comme un promoteur pour la biogenèse des gouttelettes lipidiques en recrutant et regroupant des protéines cellulaires impliquées dans le métabolisme des lipides et du stockage tel que le diacylglycérol acyltransférase 1 (DGAT1) (Herker *et al.*, 2010). La présence de trois des dix résidus (en position 75, 81 et 91) dans le domaine putatif d'homodimérisation situé entre les résidus 72 à 91 de la protéine de capsid (Boulant *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 1996), un domaine qui par ailleurs a été décrit comme interagissant avec la glycoprotéine d'enveloppe E1 (Nakai *et al.*, 2006) pourrait expliquer les différences observées entre la protéine de capsid du clone JFH-1 et sa forme optimisée S8/JFH-1. Sur un autre plan, les capacités déficientes pour la multimérisation de la protéine de capsid du clone JFH-1 pourrait contribuer à une meilleure mobilité de la protéine à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique et de ce fait avoir un trafic plus efficace vers les gouttelettes lipidiques. Bien sûr, ces hypothèses pour l'instant non vérifiées nécessiteront d'être appuyées par de nouvelles expériences, par exemple en réalisant des mutants de la protéine de capsid de JFH-1 ciblant exclusivement son domaine d'homodimérisation. Enfin, une partie de nos expériences montre que la protéine de capsid de la construction S8/JFH-1 est capable de rediriger la localisation de la protéine NS5A en dehors de la surface des gouttelettes lipidiques, un phénomène qui n'est pas observé dans les cellules transfectées avec la souche JFH-1 sauvage (**Figure 49C**, page 146). L'interaction de la protéine de capsid avec NS5A est connue pour intervenir dans les premières phases d'assemblage, permettant la délivrance de l'ARN viral à la protéine de capsid : de façon intéressante, nos résultats montrent une co-localisation protéine NS5A - protéine de capsid S8/JFH-1 strictement observée à la membrane du RE, et non pas à la surface des gouttelettes lipidiques comme cela est le cas pour la protéine de capsid JFH-1 (Miyanari *et al.*, 2007). Ceci suggère que, en plus de l'enveloppement et de la sécrétion de particules virales, les membranes du RE pourraient également être impliquées dans des événements d'assemblage plus précoces, liés à la formation de la nucléocapsid à l'interaction avec l'ARN viral nouvellement synthétisé. Ces expériences montrent en outre que la protéine NS5A est capable de trafic le long des membranes du réticulum endoplasmique en interagissant avec la protéine de capsid, selon un mécanisme probablement analogue à celui de la protéine de capsid, ces deux protéines portant une hélice α permettant une interaction avec les lipides membranaires, sans insertion dans la bicouche lipidique.

Bien que notre hypothèse vise à minimiser l'implication des gouttelettes lipidiques dans la morphogénèse virale, et finalement s'écarte du modèle actuellement admis de biogenèse des particules de VHC, il est néanmoins intéressant de noter que deux études récentes en adéquation

avec nos résultats, soulèvent la même interrogation sur le rôle des gouttelettes lipidiques dans la morphogenèse virale du VHC (Boson *et al.*, 2011; Counihan *et al.*, 2011). Bien que notre modèle *in vitro* puisse conduire à des mécanismes fortement amplifiés en comparaison de ceux se déroulant dans le foie des patients infectés, notre stratégie visant à produire une protéine de capside JFH-1 sans ses spécificités singulières, montre que l'interaction de cette protéine avec les lipides cellulaire est susceptible de variations très importantes, en lien avec la modification de seulement quelques acides aminés dans sa séquence. Ceci pourrait contribuer à expliquer les importantes variations de niveaux de stéatose observées chez les patients infectés, et finalement l'impossibilité de définir un motif canonique dans la protéine de capside pouvant expliquer simplement la survenue de stéatoses viro-induite plus ou moins sévères (Depla *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous démontrons que dix mutations ponctuelles dans la séquence de la protéine de capside JFH-1 contribuent non seulement à l'efficacité de la sécrétion de virus, mais semble également rediriger le processus complet de l'assemblage viral dans le voisinage des membranes du réticulum endoplasmique, contribuant ainsi à la production de titres élevés de particules infectieuses. En outre, nos travaux confirment la singularité de la séquence de la protéine de capside du clone JFH-1 d'un point de phylogénétique, mais aussi sur le plan de ses propriétés d'assemblage et sa localisation subcellulaire. Cependant, cette singularité demeure pour nous une interrogation, qui n'a peut-être d'explication que dans la nature particulière de cette souche isolée à partir d'un patient ayant développé une hépatite fulminante. Nos données et celles publiées antérieurement par d'autres, mettent en lumière le rôle central de la protéine de capside dans l'assemblage et la libération du virus, occupant une position cruciale entre les protéines non structurales impliquées dans la réplication de l'ARN viral et les autres protéines structurales avec l'acquisition des glycoprotéines d'enveloppe lors de la phase de bourgeonnement. De plus, nos résultats accréditent l'hypothèse qu'une protéine de capside dont la séquence est proche d'une séquence consensus pourrait ne pas s'associer aux gouttelettes lipidiques. Par conséquent, la protéine de capside restant localisée à la membrane du réticulum endoplasmique pourrait être potentiellement plus apte à interagir avec les autres composants viraux, tels que le p7, NS2, la protéine NS5A et finalement les glycoprotéines d'enveloppe. Cette mécanistique pourrait permettre d'expliquer une meilleure coordination des mécanismes d'assemblage, en lien avec les titres infectieux élevés observés pour la construction S8/JFH-1. Ainsi, la co-localisation de l'ensemble des intervenants viraux sur le même site d'assemblage

pourrait constituer un avantage pour le virus induisant une optimisation de l'ensemble des étapes du cycle viral. Dans cette optique, la protéine NS2 dont la fonction a longtemps été ignorée, pourrait assurer le rôle de plateforme en regroupant les différentes protéines nécessaires à l'assemblage du virus. Plusieurs travaux récents ont en effet montré que cette protéine transmembranaire, localisée dans les membranes du réticulum endoplasmique constituait probablement le lien entre protéines structurales et protéines non structurales au cours des phases tardives de l'assemblage et la sécrétion du VHC (Boson *et al.*, 2011; Jirasko *et al.*, 2010; Popescu *et al.*, 2011).

Conclusion et perspectives

V. Conclusion et perspectives

En ayant pour objectif de mieux comprendre les spécificités de la souche JFH-1, une première approche a eu pour but l'identification d'ORFs potentiellement présents dans le brin négatif de l'ARN de cette souche, ces ORFs pouvant potentiellement coder des protéines non identifiées à ce jour. Cette approche originale découlait du constat qu'après une analyse succincte, certains de ces ORFs étaient particulièrement bien conservés tout au long du génome du VHC, en possédant des cadres de lecture certes de longueur variable, mais s'inscrivant dans la même phase et donc susceptibles de coder des protéines conservées. Si des analyses approfondies de séquences de VHC ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs ORFs dont un grand ORF spécifique (ORF2) à la souche JFH-1, le bilan de ces travaux s'est avéré finalement décevant en n'ayant pas permis de mettre en évidence la traduction de ces ORFs, en particulier pour l'ORF2 du clone JFH-1. De la même manière, il nous a été impossible de détecter des anticorps présents dans le sérum de patients infectés dirigés contre une partie de ces « protéines ORFs » produites *in vitro*. Même si des perspectives pourraient être envisagées pour tenter de compléter ce travail (ex : recherche d'anticorps anti protéine ORF2 chez le chimpanzé infecté), il faut admettre que la recherche d'ORFs dans les séquences d'ARN négatif de VHC issues des bases de données ne peut pas se limiter au simple screening de codons d'initiation ou de codons de terminaison de la traduction, comme nous l'avons réalisé dans ce travail. Nous avons un temps essayé, à l'aide d'algorithmes dédiés, de prédire la présence d'éventuels IRES dans ces séquences d'ARNs négatifs. Cependant les résultats de ces analyses ont révélé de multiples prédictions d'IRES, complexes à interpréter, soulevant la nécessité impérieuse de nouer dans le futur des collaborations spécifiques avec des scientifiques spécialisés pour aborder cette question.

C'est probablement dans la partie du travail consacré à l'optimisation de la séquence de la capsid du clone JFH-1 que se situent les perspectives les plus intéressantes. Pour l'instant, nous avons identifié 10 résidus de cette protéine qui sont responsables de la faible production virale du clone JFH-1. Une approche qui pourra être poursuivie sera d'évaluer les rôles respectifs de ces dix résidus en réalisant soit des mutations ponctuelles, soit en associant certaines mutations au sein la séquence codant la protéine de capsid. A l'aide du clone JFH-1 sauvage, mais aussi avec notre construction S8/JFH-1, il sera ainsi relativement aisé de déterminer l'impact d'un ou plusieurs résidus étudiés en combinaison sur les propriétés et

l'efficacité de l'assemblage du VHC *in vitro*. Une seconde approche pourrait consister à réaliser globalement le même type d'approche pour les protéines p7 et NS2 : En utilisant les séquences des bases de données dont nous disposons, il pourrait être intéressant de déterminer les spécificités de ces protéines, notamment pour les souches JFH-1 et J6, vis à vis de panels de séquences non seulement de génotype 2, mais aussi de séquences de génotype 1, ces dernières étant fortement représentées dans les bases de données. De façon similaire à ce que nous avons observé pour la protéine de capsid JFH-1, il est tout à fait possible que la protéine NS2 de JFH-1, interagissant potentiellement avec la protéine de capsid (Boson *et al.*, 2011), puisse présenter des résidus rarement retrouvés dans les autres séquences génotypes 2. Qui plus est, l'observation d'éventuelles co-variations entre les résidus particuliers de core et ceux de NS2 permettrait l'identification de résidus impliqués dans leur interaction réciproque et potentiellement dans la morphogénèse du VHC.

Enfin une perspective pourrait consister à étudier l'assemblage de façon dynamique. La difficulté majeure des systèmes actuels basés sur la souche JFH-1 est qu'ils ne permettent pas une expression indépendante des différentes protéines, rendant toute étude dynamique difficile à conduire. Pour pallier cette difficulté, une approche pourrait consister à séparer la production de la protéine de capsid du reste du génome JFH-1. A cette fin, il pourrait être envisagé d'exprimer en *trans* la protéine de capsid (S8 versus JFH-1) dans des cellules Huh 7.5 répliquant un génome JFH-1 dépourvu de la séquence codant cette protéine. Cette approche pourrait permettre par exemple, à l'aide de vecteurs inducibles, d'analyser la fraction de protéine de capsid intervenant dans les processus d'assemblage, et de préciser ainsi le rôle potentiel des gouttelettes lipidiques dans ces mécanismes.

Enfin, une autre technique pourrait consister à suivre en microscopie confocale en temps réel le trafic de nos différentes protéines de capsid préalablement taguées à l'image de la stratégie développée par Counihan *et al.* En 2011. Cependant, il est probable que ce genre d'approche nécessite une mise au point complexe et fastidieuse, de même, ce type d'approche n'est peut-être pas assez sensible et résolutif pour répondre aux interrogations concernant le lieu réel d'assemblage du VHC. C'est pourquoi, nous envisageons plutôt de détecter de façon précise la localisation subcellulaire de la protéine de capsid de la construction S8/JFH-1 en microscopie électronique à transmission, et éventuellement de chercher à visualiser des particules virales en cours de formation. Il est notamment prévu d'effectuer des marquages de cette protéine en amont de l'inclusion en résine (une étape nécessaire pour la réalisation des coupes ultrafines), permettant une détection plus sensible de la localisation de la protéine de capsid. Ces

marquages seront réalisés en utilisant notamment des anticorps bi-fonctionnels constitués d'un marqueur fluorescent et couplés à une bille d'or de très faible diamètre (très inférieur à ceux classiquement utilisés ; anticorps fluoronanogold), ou en ayant recours à des marquages utilisant des anticorps couplés à la peroxydase, utilisés pour précipiter des métaux lourds au voisinage de la protéine de capsid. Ces technologies pourraient le cas échéant être combinées à des approches de tomographie sur coupe épaisse.

Bibliographie

Bibliographie

- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q.-X. (1999).** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 12766–12771.
- Aizaki, H., Lee, K.-J., Sung, V. M.-H., Ishiko, H. & Lai, M. M. . (2004).** Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* **324**, 450–461.
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A. O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2012).** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–1007.
- Alter, M. J. (2007).** Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **13**, 2436.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. & Lotteau, V. (2002).** Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol* **76**, 6919–6928.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008).** Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog* **4**, e1000035 (D. Moradpour, Ed.).
- Asselah, T. (2014).** Sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus. *Expert Opin Pharmacother* **15**, 121–130.

- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J. & Miyamura, T. (1997).** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 1200–1205.
- Bartenschlager, R. (2002).** Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 911–916.
- Bartenschlager, R. (Ed.). (2013).** *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy.* , Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004).** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**, 71–180.
- Bartenschlager, R., Cosset, F.-L. & Lohmann, V. (2010).** Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* **53**, 583–585.
- Barth, H. (2003).** Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J Biol Chem* **278**, 41003–41012.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2006).** Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *J Virol* **80**, 10579–10590.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003a).** Infectious Hepatitis C Virus Pseudoparticles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* **197**, 633–642.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F.-L. & Purcell, R. H. (2003b).** In vitro assay for neutralizing

- antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 14199–14204.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* **72**, 3827–3836.
- Beaumont, E. & Roingeard, P. (2013).** Prospects for prophylactic hepatitis C vaccines based on virus-like particles. *Hum Vaccines Immunother* **9**, 1112–1118.
- Bedossa, P. & Poynard, T. (1996).** An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* **24**, 289–293.
- Behrens, S.-E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996).** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12.
- Behrens, S.-E., Grassmann, C. W., Thiel, H.-J., Meyers, G. & Tautz, N. (1998).** Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* **72**, 2364–2372.
- Benga, W. J. A., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J. & other authors. (2010).** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**, 43–53.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. & Roingeard, P. (2002).** Hepatitis C Virus-Like Particle Morphogenesis. *J Virol* **76**, 4073–4079.
- Blanchard, E., Hourieux, C., Brand, D., Ait-Goughoulte, M., Moreau, A., Trassard, S., Sizaret, P.-Y., Dubois, F. & Roingeard, P. (2003).** Hepatitis C Virus-Like Particle Budding: Role of the Core Protein and Importance of Its Asp111. *J Virol* **77**, 10131–10138.

- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006).** Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol* **80**, 6964–6972.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000).** Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* **290**, 1972–1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002).** Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **76**, 13001–13014.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003).** Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 1a RNAs in Cell Culture. *J Virol* **77**, 3181–3190.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Schmitz, H., Hosmane, R. S., Bretner, M., Siwecka, M. A. & Kulikowski, T. (2002).** NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *ACTA Biochim Pol-Engl Ed-* **49**, 597–614.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R. & Cosset, F.-L. (2011).** A Concerted Action of Hepatitis C Virus P7 and Nonstructural Protein 2 Regulates Core Localization at the Endoplasmic Reticulum and Virus Assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1002144 (A. Pekosz, Ed.).
- Boulant, S. (2006).** Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets. *J Biol Chem* **281**, 22236–22247.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2005).** Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. *J Virol* **79**, 11353–11365.

- Boulant, S., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2007).** Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* **88**, 2204–2213.
- Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E., Etienne, L., Roingeard, P. & Meunier, J.-C. (2014a).** The Association of Hepatitis C Virus Glycoproteins with Apolipoproteins E and B Early in Assembly is Conserved in Lipoviral Particles. *J Biol Chem*.
- Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E., Etienne, L., Roingeard, P. & Meunier, J.-C. (2014b).** The Association of Hepatitis C Virus Glycoproteins with Apolipoproteins E and B Early in Assembly Is Conserved in Lipoviral Particles. *J Biol Chem* **289**, 18904–18913.
- Boyer, J. C. & Haenni, A. L. (1994).** Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415–426.
- Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C. & Cook, E. H. (1991).** Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* **34**, 206–208.
- Bradley, D. W., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Schable, C. A., Ebert, J. W. & Maynard, J. E. (1985).** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* **88**, 773–779.
- Brasaemle, D. L. & Wolins, N. E. (2012).** Packaging of Fat: An Evolving Model of Lipid Droplet Assembly and Expansion. *J Biol Chem* **287**, 2273–2279.
- Brass, V. (2002).** An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130–8139.

- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A. & De Francesco, R. (2002).** Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. *J Virol* **76**, 3482–3492.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 13034–13039.
- Bright, H., Carroll, A. R., Watts, P. A. & Fenton, R. J. (2004).** Development of a GB Virus B Marmoset Model and Its Validation with a Novel Series of Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitors. *J Virol* **78**, 2062–2071.
- Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., Timpe, J. M., Krieger, S. E., Baumert, T. F. & other authors. (2010).** Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol* **85**, 596–605.
- Brown, D. A. (2001).** Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* **11**, R446–R449.
- Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1994).** Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 8239–8243.
- Burbelo, P. D., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Medina, J. L., Henriquez, J. A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J. M. & other authors. (2012).** Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *J Virol* **86**, 6171–6178.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.-L., Pawlotsky, J.-M., Penin, F. & Dubuisson, J. (2005).** Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry. *J Virol* **79**, 15331–15341.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A. A., Haas, J. T., Ramage, H. R., Farese, R. V. & Ott, M. (2013).** Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to

- Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core. *J Biol Chem* **288**, 9915–9923.
- Catanese, M. T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T. J., Andrus, L., Rice, W. J., Silvestry, M., Kuhn, R. J. & Rice, C. M. (2013).** Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci* **110**, 9505–9510.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. (2007).** Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J Virol* **81**, 13783–13793.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R. & Barr, P. J. (1991).** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 2451–2455.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.
- Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C. S., Burgess, S., Harris, M. & Rowlands, D. (2006).** Evidence for the Formation of a Heptameric Ion Channel Complex by the Hepatitis C Virus P7 Protein in Vitro. *J Biol Chem* **281**, 37057–37068.
- Cocquerel, L., Kuo, C.-C., Dubuisson, J. & Levy, S. (2003).** CD81-Dependent Binding of Hepatitis C Virus E1E2 Heterodimers. *J Virol* **77**, 10677–10683.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* **21**, 2893–2902.

- Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R. & Randall, G. (2009).** RNA Interference and Single Particle Tracking Analysis of Hepatitis C Virus Endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702 (M. Gale, Ed.).
- Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L. & Randall, G. (2012).** Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis C Virus Secretion. *PLoS Pathog* 8, e1002466 (J. J. Ou, Ed.).
- Counihan, N. A., Rawlinson, S. M. & Lindenbach, B. D. (2011).** Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly. *PLoS Pathog* 7, e1002302 (A. Siddiqui, Ed.).
- Cristofari, G. (2004).** The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 32, 2623–2631.
- Cun, W., Jiang, J. & Luo, G. (2010).** The C-Terminal -Helix Domain of Apolipoprotein E Is Required for Interaction with Nonstructural Protein 5A and Assembly of Hepatitis C Virus. *J Virol* 84, 11532–11541.
- Deinhardt, F., Holmes, A. W., Capps, R. B. & Popper, H. (1967).** Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 125, 673–688.
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G. & Wychowski, C. (2007).** Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 88, 2495–2503.
- Depla, M., d' Alteroche, L., Le Gouge, A., Moreau, A., Hourieux, C., Meunier, J.-C., Gaillard, J., de Muret, A., Bacq, Y. & other authors. (2012).** Viral Sequence

- Variation in Chronic Carriers of Hepatitis C Virus Has a Low Impact on Liver Steatosis. *PLoS ONE* 7, e33749 (R. Ray, Ed.).
- Dixon, L. R. & Crawford, J. M. (2007).** Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C. *Liver Transpl* 13, 219–226.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T. & other authors. (2011).** A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208–211.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994).** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68, 6147–6160.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002).** Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J Virol* 76, 5974–5984.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M. & Glenn, J. S. (2004).** An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association, Correct Localization of Replication Complex Proteins, and HCV RNA Replication. *J Virol* 78, 11393–11400.
- Evans, M. J., Rice, C. M. & Goff, S. P. (2004).** Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13038–13043.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007).** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801–805.

- Everson, G. T., Sims, K. D., Rodríguez-Torres, M., Hézode, C., Lawitz, E., Bourlière, M., Loustaud-Ratti, V., Rustgi, V., Schwartz, H. & other authors. (2014).** Efficacy of an Interferon- and Ribavirin-Free Regimen of Daclatasvir, Asunaprevir, and BMS-791325 in Treatment-Naïve Patients With HCV Genotype 1 Infection. *Gastroenterology* **146**, 420–429.
- Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., Chinae, G., Gavilondo, J. V., de la Rosa, M. C., Menéndez, I., Gra, B., Dueñas-Carrera, S. & other authors. (2005).** HCV core protein localizes in the nuclei of nonparenchymal liver cells from chronically HCV-infected patients. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 1320–1328.
- Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J. & Dragic, T. (2007).** Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. *J Virol* **81**, 8072–8079.
- Farci, P., Bukh, J. & Purcell, R. H. (2005).** Natural History and Experimental Models. In *Viral Hepat*, pp. 439–467. Blackwell Publishing Ltd.
- Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., Baumert, T. F., Rappoport, J. Z., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2012).** Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *J Virol* **86**, 4305–4316.
- Fauquet, C. M. & Mayo, M. A. (2001).** The 7th ICTV report. *Arch Virol* **146**, 189–194.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975).** Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767–770.
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005).** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967–972.
- Ferraris, P., Blanchard, E. & Roingeard, P. (2010).** Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* **91**, 2230–2237.

- Ferraris, P., Beaumont, E., Uzbekov, R., Brand, D., Gaillard, J., Blanchard, E. & Roingeard, P. (2013).** Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1297–1306.
- Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. & McKeating, J. A. (1999).** Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* **73**, 6782–6790.
- Forns, X., Bukh, J. & Purcell, R. H. (2002).** The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* **37**, 684–695.
- De Francesco, R. & Migliaccio, G. (2005).** Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* **436**, 953–960.
- Fraser, C. S. & Doudna, J. A. (2007).** Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* **5**, 29–38.
- Friebe, P. & Bartenschlager, R. (2002).** Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication. *J Virol* **76**, 5326–5338.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001).** Sequences in the 5' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus Required for RNA Replication. *J Virol* **75**, 12047–12057.
- Fromentin, R., Majeau, N., Gagné, M.-E. L., Boivin, A., Duvignaud, J.-B. & Leclerc, D. (2007).** A method for in vitro assembly of hepatitis C virus core protein and for screening of inhibitors. *Anal Biochem* **366**, 37–45.
- Fujimoto, T. (2004).** [Lipid droplet as an independent organelle]. *Seikagaku* **76**, 578–584.
- Gailhouste, L., Grand, Y. L., Odin, C., Guyader, D., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Guilbert, T., Bessard, A. & other authors. (2010).** Fibrillar collagen scoring by

- second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *J Hepatol* **52**, 398–406.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W. & Lai, M. M. C. (2004).** Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *J Virol* **78**, 3480–3488.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008).** Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *J Virol* **82**, 2120–2129.
- Gastaminza, P., Dryden, K. A., Boyd, B., Wood, M. R., Law, M., Yeager, M. & Chisari, F. V. (2010).** Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *J Virol* **84**, 10999–11009.
- Gawlik, K., Baugh, J., Chatterji, U., Lim, P. J., Bobardt, M. D. & Gallay, P. A. (2014).** HCV Core Residues Critical for Infectivity Are Also Involved in Core-NS5A Complex Formation. *PLoS ONE* **9**, e88866 (S. J. Polyak, Ed.).
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H. & other authors. (2009).** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401.
- Gentzsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P. M., Frentzen, A., Kaderali, L. & Pietschmann, T. (2013).** Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLoS Pathog* **9**, e1003355 (A. Siddiqui, Ed.).
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.-L., Montpellier, C. & Dubuisson, J. (2005).** Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *J Virol* **79**, 8400–8409.

- Goh, P.-Y., Tan, Y.-J., Lim, S. P., Lim, S. G., Tan, Y. H. & Hong, W. J. (2001).** The Hepatitis C Virus Core Protein Interacts with NS5A and Activates Its Caspase-Mediated Proteolytic Cleavage. *Virology* **290**, 224–236.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003).** Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J Virol* **77**, 5487–5492.
- Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Mathiesen, C. K., Meuleman, P., Serre, S. B. N., Lademann, J. B., Ghanem, L., Scheel, T. K. H., Leroux-Roels, G. & Bukh, J. (2011).** Development and Application of Hepatitis C Reporter Viruses with Genotype 1 to 7 Core-Nonstructural Protein 2 (NS2) Expressing Fluorescent Proteins or Luciferase in Modified JFH1 NS5A. *J Virol* **85**, 8913–8928.
- Gottwein, J. M., Jensen, S. B., Serre, S. B. N., Ghanem, L., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Krarup, H., Uzcategui, N., Mikkelsen, L. S. & Bukh, J. (2013a).** Adapted J6/JFH1-Based Hepatitis C Virus Recombinants with Genotype-Specific NS4A Show Similar Efficacies against Lead Protease Inhibitors, Alpha Interferon, and a Putative NS4A Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 6034–6049.
- Gottwein, J. M., Jensen, S. B., Li, Y.-P., Ghanem, L., Scheel, T. K. H., Serre, S. B. N., Mikkelsen, L. & Bukh, J. (2013b).** Combination Treatment with Hepatitis C Virus Protease and NS5A Inhibitors Is Effective against Recombinant Genotype 1a, 2a, and 3a Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1291–1303.
- Ait-Goughoulte, M. (2006).** Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol* **87**, 855–860.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruysschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2009).** Identification of a Novel

- Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J Virol* **83**, 6257–6268.
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F. & Moradpour, D. (2010).** Amphipathic -Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J Virol* **84**, 12529–12537.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993).** Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* **67**, 2832–2843.
- Von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007).** Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology* **132**, 667–678.
- Harris, C., Herker, E., Farese, R. V. & Ott, M. (2011).** Hepatitis C Virus Core Protein Decreases Lipid Droplet Turnover: A MECHANISM FOR CORE-INDUCED STEATOSIS. *J Biol Chem* **286**, 42615–42625.
- Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H. & other authors. (2008).** CD81 and Claudin 1 Coreceptor Association: Role in Hepatitis C Virus Entry. *J Virol* **82**, 5007–5020.
- Helle, F. & Dubuisson, J. (2008).** Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **65**, 100–112.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.-Y., Fourn, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007).** The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *J Virol* **81**, 8101–8111.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G. & Dubuisson, J. (2010).** Role of N-Linked Glycans in

- the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Incorporated into Infectious Virions. *J Virol* **84**, 11905–11915.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V. & Ott, M. (2010).** Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* **16**, 1295–1298.
- Hermansteyne, K. A., Bangsberg, D. R., Hennessey, K., Weinbaum, C. & Hahn, J. A. (2012).** The association between use of non-injection drug implements and hepatitis C virus antibody status in homeless and marginally housed persons in San Francisco. *J Public Health* **34**, 330–339.
- Honda, M., Beard, M. R., Ping, L.-H. & Lemon, S. M. (1999).** A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* **73**, 1165–1174.
- Honegger, J., Zhou, Y. & Walker, C. (2014).** Will There Be a Vaccine to Prevent HCV Infection? *Semin Liver Dis* **34**, 079–088.
- Hope, R. G., Murphy, D. J. & McLauchlan, J. (2002).** The Domains Required to Direct Core Proteins of Hepatitis C Virus and GB Virus-B to Lipid Droplets Share Common Features with Plant Oleosin Proteins. *J Biol Chem* **277**, 4261–4270.
- Hourieux, C., Ait-Goughoulte, M., Patient, R., Fouquenot, D., Arcanger-Doudet, F., Brand, D., Martin, A. & Roingeard, P. (2007).** Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* **9**, 1014–1027.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 7271–7276.

- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M. & Ye, J. (2007).** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci* **104**, 5848–5853.
- Hügler, T., Fehrman, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H.-G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001).** The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Is an Integral Endoplasmic Reticulum Membrane Protein. *Virology* **284**, 70–81.
- Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y. & Poynard, T. (2001).** Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *The Lancet* **357**, 1069–1075.
- Ivanyi-Nagy, R., Kanevsky, I., Gabus, C., Lavergne, J.-P., Ficheux, D., Penin, F., Fosse, P. & Darlix, J.-L. (2006).** Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* **34**, 2618–2633.
- Jeannel, D., Fretz, C., Traore, Y., Kohdjo, N., Bigot, A., Pe Gamy, E., Jourdan, G., Kourouma, K., Maertens, G. & other authors. (1998).** Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol* **55**, 92–97.
- Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H. & Luo, G. (2012).** Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol* **86**, 7256–7267.
- Ji, H., Fraser, C. S., Yu, Y., Leary, J. & Doudna, J. A. (2004).** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16990–16995.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2010).** Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein

- 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *PLoS Pathog* **6**, e1001233 (M. S. Diamond, Ed.).
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007).** Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol* **81**, 8374–8383.
- Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2009).** The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *J Virol* **83**, 2163–2177.
- Jones, D. M., Atoom, A. M., Zhang, X., Kottitil, S. & Russell, R. S. (2011).** A Genetic Interaction between the Core and NS3 Proteins of Hepatitis C Virus Is Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol* **85**, 12351–12361.
- Jopling, C. L. (2005).** Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1994).** Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 320–326.
- Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H. & Kamada, T. (1994).** Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* **19**.
- Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2005).** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2561–2566.
- Kaplan, G. & Racaniello, V. R. (1988).** Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. *J Virol* **62**, 1687–1696.

- Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J. A., Firth, C., Hirschberg, D. L., Rice, C. M. & other authors. (2011).** Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 11608–11613.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., Wakita, T. & others. (2001).** Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient*. *J Med Virol* **64**, 334–339.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003).** Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808–1817.
- Kato, T., Choi, Y., Elmowalid, G., Sapp, R. K., Barth, H., Furusaka, A., Mishiro, S., Wakita, T., Krawczynski, K. & Liang, T. J. (2008).** Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology* **48**, 732–740.
- Khaliq, S., Jahan, S. & Pervaiz, A. (2011).** Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* **11**, 543–556.
- Khromykh, A. A. & Westaway, E. G. (1997).** Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* **71**, 1497–1505.
- Kim, S., Welsch, C., Yi, M. & Lemon, S. M. (2011).** Regulation of the Production of Infectious Genotype 1a Hepatitis C Virus by NS5A Domain III. *J Virol* **85**, 6645–6656.
- Klein, K. C., Polyak, S. J. & Lingappa, J. R. (2004).** Unique Features of Hepatitis C Virus Capsid Formation Revealed by De Novo Cell-Free Assembly. *J Virol* **78**, 9257–9269.
- Klein, K. C., Dellos, S. R. & Lingappa, J. R. (2005).** Identification of Residues in the Hepatitis C Virus Core Protein That Are Critical for Capsid Assembly in a Cell-Free System. *J Virol* **79**, 6814–6826.

- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997).** Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570–574.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1996).** Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**, 3363–3371.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006).** Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J Virol* **80**, 5308–5320.
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C. & other authors. (2010).** Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144–1157.
- Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M. & Watowich, S. J. (2001).** Self-Assembly of Nucleocapsid-Like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol* **75**, 2119–2129.
- Kunkel, M. & Watowich, S. J. (2004).** Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Lett* **557**, 174–180.
- Kushima, Y., Wakita, T. & Hijikata, M. (2010).** A Disulfide-Bonded Dimer of the Core Protein of Hepatitis C Virus Is Important for Virus-Like Particle Production. *J Virol* **84**, 9118–9127.
- Kwo, P. Y., Lawitz, E. J., McCone, J., Schiff, E. R., Vierling, J. M., Pound, D., Davis, M. N., Galati, J. S., Gordon, S. C. & Ravendhran, N. (2010).** Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in

- treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *The Lancet* **376**, 705–716.
- Lauer, G. M. & Walker, B. D. (2001).** Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**, 41–52.
- Lavanchy, D. (2011).** Evolving epidemiology of hepatitis C virus: Epidemiology of HCV. *Clin Microbiol Infect* **17**, 107–115.
- Lawitz, E., Mangia, A., Wyles, D., Rodriguez-Torres, M., Hassanein, T., Gordon, S. C., Schultz, M., Davis, M. N., Kayali, Z. & other authors. (2013).** Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *N Engl J Med* **368**, 1878–1887.
- Lawitz, E., Sulkowski, M. S., Ghalib, R., Rodriguez-Torres, M., Younossi, Z. M., Corregidor, A., DeJesus, E., Pearlman, B., Rabinovitz, M. & other authors. (2014).** Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet*.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. & Weber, P. C. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* **6**, 937–943.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M. & Lemon, S. M. (2005a).** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992–2997.
- Liljestrom, P. & Garoff, H. (1991).** A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnol Nat Publ Co* **9**, 1356–1361.
- Lindenbach, B. D. (2005).** Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309**, 623–626.

- Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K. F., Pyle, A. M., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. *J Virol* **81**, 8905–8918.
- Lindenbach, B. (2013).** Virion Assembly and Release. In *Hepat C Virus Mol Virol Antivir Ther*, Current Topics in Microbiology and Immunology, pp. 199–218. Edited by R. Bartenschlager. Springer Berlin Heidelberg.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E. & Leroux-Roels, G. (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3805–3809.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b).** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17717–17722.
- Lohmann, V. (1999).** Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285**, 110–113.
- Lohmann, V. (2013).** Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 167–198.
- Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2013).** On the History of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems: Miniperspective. *J Med Chem* 131121154331001.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. (1997).** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **71**, 8416–8428.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. (2006).** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.

- Lu, L., Murphy, D., Li, C., Liu, S., Xia, X., Pham, P. H., Jin, Y., Hagedorn, C. H. & Abe, K. (2008).** Complete genomes of three subtype 6t isolates and analysis of many novel hepatitis C virus variants within genotype 6. *J Gen Virol* **89**, 444–452.
- Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J. & Colonno, R. J. (2000).** De Novo Initiation of RNA Synthesis by the RNA-Dependent RNA Polymerase (NS5B) of Hepatitis C Virus. *J Virol* **74**, 851–863.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M. & other authors. (2011).** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**, 589–595.
- Machlin, E. S., Sarnow, P. & Sagan, S. M. (2011).** Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 3193–3198.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R. & Budkowska, A. (2001).** Nonenveloped Nucleocapsids of Hepatitis C Virus in the Serum of Infected Patients. *J Virol* **75**, 8240–8250.
- Majeau, N. (2004).** The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *J Gen Virol* **85**, 971–981.
- Majeau, N., Fromentin, R., Savard, C., Duval, M., Tremblay, M. J. & Leclerc, D. (2009).** Palmitoylation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Important for Virion Production. *J Biol Chem* **284**, 33915–33925.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. & other authors. (2008).** Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *J Virol* **82**, 7964–7976.

- Mateu, G., Donis, R. O., Wakita, T., Bukh, J. & Grakoui, A. (2008).** Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology* **376**, 397–407.
- Matsumoto, M., HWANG, S. B., JENG, K.-S., ZHU, N. & LAI, M. (1996).** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**, 43–51.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008).** NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. *J Virol* **82**, 7624–7639.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. & Yi, M. (2011).** Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J Virol* **85**, 86–97.
- Maylin, S., Martinot–Peignoux, M., Moucari, R., Boyer, N., Ripault, M., Cazals–Hattem, D., Giuily, N., Castelnau, C., Cardoso, A. C. & other authors. (2008).** Eradication of Hepatitis C Virus in Patients Successfully Treated for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* **135**, 821–829.
- McHutchison, J. G., Everson, G. T., Gordon, S. C., Jacobson, I. M., Sulkowski, M., Kauffman, R., McNair, L., Alam, J. & Muir, A. J. (2009).** Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **360**, 1827–1838.
- McLauchlan, J. (2000).** Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **7**, 2–14.
- McLauchlan, J. (2002).** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980–3988.
- Meffre, C., Le Strat, Y., Delarocque-Astagneau, E., Dubois, F., Antona, D., Lemasson, J.-M., Warszawski, J., Steinmetz, J., Coste, D. & other authors. (2010).** Prevalence of

- hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: Social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J Med Virol* **82**, 546–555.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L. & Simmonds, P. (1995).** Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J Gen Virol* **76**, 2493–2507.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. (2011).** Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. *J Biol Chem* **286**, 3018–3032.
- Meuleman, P., Catanese, M. T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C. T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R. & other authors. (2012).** A Human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**, 364–372.
- Meunier, J.-C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2008).** Apolipoprotein C1 Association with Hepatitis C Virus. *J Virol* **82**, 9647–9656.
- Meunier, J.-C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2005).** Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4560–4565.
- Mittelholzer, C., Moser, C., Tratschin, J.-D. & Hofmann, M. A. (1997).** Generation of cytopathogenic subgenomic RNA of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines. *Virus Res* **51**, 125–137.
- Miyamoto, H., Okamoto, H., Sato, K., Tanaka, T. & Mishiro, S. (1992).** Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **73**, 715–8.

- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007).** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089–1097.
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. (2013).** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**, 1333–1342.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P. & other authors. (2007).** The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* **46**, 411–419.
- Montserret, R., Saint, N., Vanbelle, C., Salvay, A. G., Simorre, J.-P., Ebel, C., Sapay, N., Renisio, J.-G., Bockmann, A. & other authors. (2010).** NMR Structure and Ion Channel Activity of the p7 Protein from Hepatitis C Virus. *J Biol Chem* **285**, 31446–31461.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004).** Membrane Association of the RNA-Dependent RNA Polymerase Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **78**, 13278–13284.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T. & Wands, J. R. (1996).** Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* **222**, 51–63.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453–463.

- Morikawa, K., Lange, C. M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F. & Moradpour, D. (2011).** Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus: HCV NS3-4A. *J Viral Hepat* **18**, 305–315.
- Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. (1995).** Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* **69**, 5621–5630.
- Murayama, A., Date, T., Morikawa, K., Akazawa, D., Miyamoto, M., Kaga, M., Ishii, K., Suzuki, T., Kato, T. & other authors. (2007).** The NS3 Helicase and NS5B-to-3'X Regions Are Important for Efficient Hepatitis C Virus Strain JFH-1 Replication in Huh7 Cells. *J Virol* **81**, 8030–8040.
- Murphy, D. J. & Vance, J. (1999).** Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* **24**, 109–115.
- Murray, C. L., Jones, C. T., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007).** Alanine Scanning of the Hepatitis C Virus Core Protein Reveals Numerous Residues Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol* **81**, 10220–10231.
- Nakai, K., Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Ishii, K., Lim, C. K., Tani, H., Matsuo, E., Abe, T., Mori, Y. & other authors. (2006).** Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with the Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. *J Virol* **80**, 11265–11273.
- Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H. & Shimizu, Y. K. (1996).** Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol* **70**, 3325–3329.
- Nakamura, N., Akashi, T., Taneda, T., Kogo, H., Kikuchi, A. & Fujimoto, T. (2004).** ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 957–965.

- Negro, F. & Alberti, A. (2011).** The global health burden of hepatitis C virus infection: Editorial. *Liver Int* **31**, 1–3.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W. & Toms, G. L. (2006).** Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *J Virol* **80**, 2418–2428.
- Okamoto, H., Machida, A., Miyakawa, Y. & MayumP, M. (1991).** Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* **72**, 2697–2704.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (2008).** Intramembrane Processing by Signal Peptide Peptidase Regulates the Membrane Localization of Hepatitis C Virus Core Protein and Viral Propagation. *J Virol* **82**, 8349–8361.
- Otto, G. A. & Puglisi, J. D. (2004).** The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**, 369–380.
- OuYang, B., Xie, S., Berardi, M. J., Zhao, X., Dev, J., Yu, W., Sun, B. & Chou, J. J. (2013).** Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus. *Nature* **498**, 521–525.
- Ozeki, S. (2005).** Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* **118**, 2601–2611.
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D. & Bartenschlager, R. (2011).** NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J Virol* **85**, 6963–6976.
- Pawlotsky, J., Chevaliez, S. & McHutchison, J. G. (2007).** The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies. *Gastroenterology* **132**, 1979–1998.

- Payen, J.-L. & Rongieres, M. (2002).** [History of hepatitis. I. From jaundice to viruses]. *Rev Prat* **52**, 2097–2100.
- Pène, V., Hernandez, C., Vauloup-Fellous, C., Garaud-Aunis, J. & Rosenberg, A. R. (2009).** Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *J Viral Hepat* **16**, 705–715.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.-O., Deleage, G. & Pawlotsky, J.-M. (2001).** Conservation of the Conformation and Positive Charges of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Hypervariable Region 1 Points to a Role in Cell Attachment. *J Virol* **75**, 5703–5710.
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I. & Hellen, C. U. (2001).** Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 7029–7036.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998).** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**, 67–83.
- Petit, M.-A., Lièvre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R. W. H. & Trépo, C. (2005).** Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* **336**, 144–153.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K. & Bartenschlager, R. (2001).** Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs. *J Virol* **75**, 1252–1264.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M. & Cosset, F.-L. (2006).** Construction and

- characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 7408–7413.
- Pileri, P. (1998).** Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941.
- Piver, E., Gaillard, J., Boyer, A., Dumans, A., Roingeard, P. & Meunier, J. C. (2014).** Morphological Characterization of Hepatitis C Particles - 14ème Réunion du Réseau National Hépatites de l'ANRS.
- Ploss, A. & Evans, M. J. (2012).** Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol* **2**, 14–19.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886.
- Ploss, A., Khetani, S. R., Jones, C. T., Syder, A. J., Trehan, K., Gaysinskaya, V. A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C. M. & Bhatia, S. N. (2010).** Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 3141–3145.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pene, V., Aoudjehane, L., Carriere, M., Zaidi, S., Hernandez, C., Calle, V., Meritet, J.-F. & other authors. (2010).** Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 1355–1364.
- Popescu, C.-I. & Dubuisson, J. (2010).** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* **102**, 63–74.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L. & other authors. (2011).** NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278 (C. M. Walker, Ed.).
- Poynard, T., Ratziu, V., Benhamou, Y., Thabut, D. & Moussalli, J. (2005).** Progression of Fibrosis. In *Viral Hepat*, pp. 511–519. Blackwell Publishing Ltd.

- Pybus, O. G. (2003).** The Epidemiology and Iatrogenic Transmission of Hepatitis C Virus in Egypt: A Bayesian Coalescent Approach. *Mol Biol Evol* **20**, 381–387.
- Raney, K. D., Sharma, S. D., Moustafa, I. M. & Cameron, C. E. (2010).** Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. *J Biol Chem* **285**, 22725–22731.
- Reddy, K. R., Hoofnagle, J. H., Tong, M. J., Lee, W. M., Pockros, P., Heathcote, E. J., Albert, D. & Joh, T. (1999).** Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Hepatology* **30**, 787–793.
- Rehermann, B. & Nascimbeni, M. (2005).** Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 215–229.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Carroll, A. R., Clarke, B. E., Rowlands, D. J. & Jackson, R. J. (1996).** Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* **2**, 867–878.
- Robenek, M. J., Severs, N. J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.-P., Troyer, D. & Robenek, H. (2004).** Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **18**, 866–868.
- Roberts, E. A. & Yeung, L. (2002).** Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **36**, s106–s113.
- Roingeard, P. & Hourieux, C. (2007).** Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis: HCV core, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* **15**, 157–164.
- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D. & Ait-Goughoulte, M. (2004).** Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* **96**, 103–108.

- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E. & Prensier, G. (2008).** Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy. *Histochem Cell Biol* **130**, 561–566.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S. & other authors. (2012).** Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog* **8**, e1003056 (G. G. Luo, Ed.).
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H. & other authors. (2006).** Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System That Efficiently Replicates the Virus. *J Virol* **80**, 2832–2841.
- Ruggieri, A., Argentini, C., Kouruma, F., Chionne, P., D’Ugo, E., Spada, E., Dettori, S., Sabbatani, S. & Rapicetta, M. (1996).** Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *J Gen Virol* **77**, 2073–2076.
- Russell, R. S., Meunier, J.-C., Takikawa, S., Faulk, K., Engle, R. E., Bukh, J., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2008).** Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 4370–4375.
- Saeed, M., Shiina, M., Date, T., Akazawa, D., Watanabe, N., Murayama, A., Suzuki, T., Watanabe, H., Hiraga, N. & other authors. (2011).** In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* **54**, 425–433.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K. & other authors. (2012).** Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* **18**, 281–285.

- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 11646–11651.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994).** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **68**, 3631–3641.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**, 5017–5025.
- Scheel, T. K., Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Prentoe, J. C., Hoegh, A. M., Alter, H. J., Eugen-Olsen, J. & Bukh, J. (2008).** Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 997–1002.
- Scheel, T. K. H., Gottwein, J. M., Mikkelsen, L. S., Jensen, T. B. & Bukh, J. (2011).** Recombinant HCV Variants With NS5A From Genotypes 1–7 Have Different Sensitivities to an NS5A Inhibitor but Not Interferon- α . *Gastroenterology* **140**, 1032–1042.e6.
- Schlauder, G. G., Pilot-Matias, T. J., Gabriel, G. S., Simons, J. N., Muerhoff, A. S., Dawson, G. J. & Mushahwar, I. K. (1995).** Origin of GB-hepatitis viruses. *Lancet* **346**, 447–448.
- Schlesinger, S. & Dubensky Jr, T. W. (1999).** Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 434–439.
- Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F. & Tautz, N. (2009).** Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 5342–5347.

- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T. S. B. & Ott, M. (2004). Targeting of Hepatitis C Virus Core Protein to Mitochondria through a Novel C-Terminal Localization Motif. *J Virol* **78**, 7958–7968.
- Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* **36**, s35–s46.
- Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L. & Goeser, T. (1997). Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol* **78**, 2467–2476.
- Sharma, K. K., de Rocquigny, H., Darlix, J. L., Lavergne, J.-P., Penin, F., Lessinger, J.-M. & Mely, Y. (2012). Analysis of the RNA chaperoning activity of the hepatitis C virus core protein on the conserved 3'X region of the viral genome. *Nucleic Acids Res* **40**, 2540–2553.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J. & Bartenschlager, R. (2007). The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly. *J Biol Chem* **282**, 37158–37169.
- Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1992). Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 5477–5481.
- Shi, S. T., Polyak, S. J., Tu, H., Taylor, D. R., Gretch, D. R. & Lai, M. M. C. (2002). Hepatitis C Virus NS5A Colocalizes with the Core Protein on Lipid Droplets and Interacts with Apolipoproteins. *Virology* **292**, 198–210.
- Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T. J., Qi, Y., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Jin, Y., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. (2011). A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms. *PLoS Biol* **9**, e1001041 (J. R. McIntosh, Ed.).

- Sievert, W., Altraif, I., Razavi, H. A., Abdo, A., Ahmed, E. A., AlOmair, A., Amarapurkar, D., Chen, C.-H., Dou, X. & other authors. (2011).** A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt: A systemics review of epidemiology in Asia. *Liver Int* **31**, 61–80.
- Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U. H., Klein, R., Bressanelli, S. & Lohmann, V. (2009).** Structural and Functional Analysis of Hepatitis C Virus Strain JFH1 Polymerase. *J Virol* **83**, 11926–11939.
- Simmonds, P. (2004).** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J Gen Virol* **85**, 3173–3188.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C. & other authors. (2005).** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962–973.
- Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L. & Chalmers, M. L. (1995).** Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 3401–3405.
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T. & Simmonds, P. (2014).** Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–327.
- Sominskaya, I., Alekseeva, E., Skrastina, D., Mokhonov, V., Starodubova, E., Jansons, J., Levi, M., Prilipov, A., Kozlovskaya, T. & Smirnov, V. (2006).** Signal sequences modulate the immunogenic performance of human hepatitis C virus E2 gene. *Mol Immunol* **43**, 1941–1952.

- Stamataki, Z., Coates, S., Abrignani, S., Houghton, M. & McKeating, J. A. (2011).** Immunization of human volunteers with hepatitis C virus envelope glycoproteins elicits antibodies that cross-neutralize heterologous virus strains. *J Infect Dis* jir399.
- Stapleton, J. T., Fountis, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. & Simmonds, P. (2011).** The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* **92**, 233–246.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007).** Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Stone, M., Jia, S., Heo, W. D., Meyer, T. & Konan, K. V. (2007).** Participation of Rab5, an Early Endosome Protein, in Hepatitis C Virus RNA Replication Machinery. *J Virol* **81**, 4551–4563.
- Stumpf, M. P. H. & Pybus, O. G. (2002).** Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 143–152.
- Sugiyama, K., Suzuki, K., Nakazawa, T., Funami, K., Hishiki, T., Ogawa, K., Saito, S., Shimotohno, K. W., Suzuki, T. & other authors. (2009).** Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. *J Virol* **83**, 6922–6928.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M. (2005).** Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J Virol* **79**, 2689–2699.
- Swadling, L., Klenerman, P. & Barnes, E. (2013).** Ever closer to a prophylactic vaccine for HCV. *Expert Opin Biol Ther* **13**, 1109–1124.

- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J. & Shimotohno, K. (1995).** A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 744–749.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.-J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996).** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307–3312.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S. & Shimotohno, K. (1995).** Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* **69**, 3980–3986.
- Tan, S.-L. & Katze, M. G. (2001).** How Hepatitis C Virus Counteracts the Interferon Response: The Jury Is Still out on NS5A. *Virology* **284**, 1–12.
- Targett-Adams, P., Chambers, D., Gledhill, S., Hope, R. G., Coy, J. F., Girod, A. & McLauchlan, J. (2003).** Live Cell Analysis and Targeting of the Lipid Droplet-binding Adipocyte Differentiation-related Protein. *J Biol Chem* **278**, 15998–16007.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008).** Maturation of Hepatitis C Virus Core Protein by Signal Peptide Peptidase Is Required for Virus Production. *J Biol Chem* **283**, 16850–16859.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005).** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374–379.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. (2008).** Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathog* **4**, e1000032 (A. Garcia-Sastre, Ed.).
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004).** The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *J Biol Chem* **279**, 48576–48587.
- Thiel, H. J., Collett, M. S., Gould, E. A., Heinz, F. X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R. H. & Rice, C. M. (2005).** Family Flaviviridae In Virus Taxonomy, (C.M. Fauquet,

- M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, Eds.) VIIIth Report of the ICTV. San Diego USA Acad Press 979–996.
- Dao Thi, V. L., Granier, C., Zeisel, M. B., Guerin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R. & other authors. (2012).** Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *J Biol Chem* **287**, 31242–31257.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.-H., Köchel, H. G. & Uy, A. (1992).** Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **181**, 293–300.
- Timpe, J. M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L. & other authors. (2007).** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**, 17–24.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476–1483.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H. & Dubuisson, J. (2010).** Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *J Virol* **84**, 10159–10168.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G. & other authors. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791–796.
- Wang, C., Gale Jr., M., Keller, B. C., Huang, H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Ye, J. (2005).** Identification of FBL2 As a Geranylgeranylated Cellular Protein Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Mol Cell* **18**, 425–434.

- Welsch, C., Albrecht, M., Maydt, J., Herrmann, E., Welker, M. W., Sarrazin, C., Scheidig, A., Lengauer, T. & Zeuzem, S. (2007).** Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *J Mol Graph Model* **26**, 546–557.
- Witteveldt, J., Evans, M. J., Bitzegeo, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A. M., Angus, A. G. N., Keck, Z.-Y., Fount, S. K. H., Pietschmann, T. & other authors. (2009).** CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**, 48–58.
- Wolins, N. E. (2001).** TIP47 Associates with Lipid Droplets. *J Biol Chem* **276**, 5101–5108.
- Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M. & Weinman, S. A. (2010).** Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLoS Pathog* **6**, e1001087 (C. M. Rice, Ed.).
- Wunschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. & Stapleton, J. T. (2000).** Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) and HCV E2 Interactions with CD81 and the Low-Density Lipoprotein Receptor. *J Virol* **74**, 10055–10062.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & Bukh, J. (1997).** Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 8738–8743.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003).** 3' Nontranslated RNA Signals Required for Replication of Hepatitis C Virus RNA. *J Virol* **77**, 3557–3568.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2007).** Compensatory Mutations in E1, p7, NS2, and NS3 Enhance Yields of Cell Culture-Infectious Intergenotypic Chimeric Hepatitis C Virus. *J Virol* **81**, 629–638.
- Yi, M., Hu, F., Joyce, M., Saxena, V., Welsch, C., Chavez, D., Guerra, B., Yamane, D., Veselenak, R. & other authors. (2014).** Evolution of a Cell Culture-Derived Genotype

- 1a Hepatitis C Virus (H77S.2) during Persistent Infection with Chronic Hepatitis in a Chimpanzee. *J Virol* **88**, 3678–3694.
- Yu, K. L., Jang, S. I. & You, J. C. (2009).** Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res* **145**, 285–292.
- Yu, W., Bartosch, B., Zhang, P., Guo, Z., Renzi, P. M., Shen, L., Granier, C., Feinstone, S. M., Cosset, F.-L. & Purcell, R. H. (2004).** Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7705–7710.
- Zeisel, M. B., Felmlee, D. J. & Baumert, T. F. (2013).** Hepatitis C Virus Entry. In *Hepat C Virus Mol Virol Antivir Ther*, pp. 87–112. Edited by R. Bartenschlager. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y. N. & Hong, Z. (2000).** De Novo Initiation of RNA Synthesis by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. *J Virol* **74**, 2017–2022.

Loïc ETIENNE

**Assemblage et sécrétion du virus de
l'hépatite C :**

**Identification de dix résidus de la protéine de
capside importants pour optimiser la
production du virus *in vitro***

Résumé

La mise au point en 2005 d'un modèle de propagation sur lignée d'hépatocarcinome basé sur la souche hautement répliquative JFH-1 fut une formidable opportunité d'étudier les différentes étapes du cycle infectieux du VHC. Nous avons souhaité étudier les étapes de morphogenèse et de sécrétion du virus, des phases du cycle viral qui sont largement mal connues encore aujourd'hui, mais où la protéine de capsid joue probablement un rôle majeur. Des études comparatives des séquences de capsides de différentes souches du VHC nous ont permis de mettre en évidence 10 résidus spécifiques à la souche JFH-1 qui pourraient expliquer les déficits fonctionnels connus de cette protéine. En effet, le remplacement de ces 10 résidus par ceux plus communément retrouvés dans les souches de génotype 1 et 2 a permis une amélioration significative de l'assemblage et de la sécrétion des particules infectieuses produites. La mise au point de cette souche optimisée pour la production de virus pourrait par ailleurs permettre constituer un atout pour mieux comprendre la structure du virus par des techniques de microscopie électronique ; ce type d'étude n'ayant pas pu être véritablement menée jusqu'à présent, en raison des titres infectieux insuffisants obtenus avec la souche JFH-1 sauvage.

Résumé en anglais

Development and cloning in 2005 of the highly replicative strain JFH-1 was a great opportunity to study the different stages of the infectious cycle of HCV as this strain easily propagate in the hepatocellular carcinoma cell line. Until now, these late phases of particles assembly remain poorly understood, although the core protein is thought to probably play a major role in initiation of these mechanisms. Comparative studies of the capsid sequences of different strains of hepatitis C have allowed us to identify 10 specific residues in the JFH-1 strain that could explain the functional deficits of this protein. Indeed, the replacement in JFH-1 strain of these 10 residues by those most commonly found in strains of genotype 1 and 2 showed improvement of the assembly and secretion of new infectious particles and new subcellular localization of core. In addition, replacement of these ten residues by most common amino acid found in patients show a great enhancement of *in vitro* virus production and secretion. As a perspective, development of this optimized virus could also represent a valuable model to better purify and determine viral structure, and true viral assembly site; HCV fields that remain till now largely unknown.