

UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE 549 Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

INSERM U966

Morphogenèse & Antigénicité du VIH et des virus des hépatites

THÈSE présentée par :

Laura ESTEBAN RIESCO

soutenue le : **07 Décembre 2012**

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

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

**Rôle des anticorps neutralisants autologues
dans la guérison spontanée lors d'une
infection par le virus de l'hépatite C**

THÈSE dirigée par :

M. GOUDEAU Alain

Professeur, Université François Rabelais, Tours

THÈSE co-encadrée par :

Mme GAUDY-GRAFFIN Catherine

Maître de Conférences, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme CASTELAIN Sandrine

Maître de Conférences, Université de Picardie Jules Verne, Amiens

M. LAVILLETTE Dimitri

Chargé de Recherche CNRS, HDR, Lyon I

JURY :

Mme CASTELAIN Sandrine

Maître de Conférences, Université de Picardie Jules Verne, Amiens

Mme GAUDY-GRAFFIN Catherine

Maître de Conférences, Université François Rabelais, Tours

M. GOUDEAU Alain

Professeur, Université François Rabelais, Tours

M. LAVILLETTE Dimitri

Chargé de Recherche CNRS, HDR, Lyon I

Mme ROQUE AFONSO Anne Marie

Professeur, Université Paris-Sud

M. THIBAUT Gilles

Professeur, Université François Rabelais, Tours

A l'as de trêfle qu'a piqué mon cœur y a nuestra aceitunita

Remerciements

“Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades.”

“Aie confiance dans le temps qui passe, il apporte souvent des issues heureuses aux nombreuses difficultés que l'on rencontre »

Miguel de Cervantes Saavedra (1547-1616), écrivain espagnol.

*Merci au Professeur **Anne Marie Roque Afonso** d'avoir accepté de juger mon travail en présidant mon jury de thèse. Merci à Madame **Sandrine Castelain** et Monsieur **Dimitri Lavillette** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux et au Professeur **Gilles Thibault** d'en être l'examineur. Honorée d'être jugée par mes pairs, c'est avec un grand intérêt que j'attends de discuter avec vous de ce travail.*

***Catherine** tout d'abord je tiens à te remercier de m'avoir proposé de poursuivre ma route par une thèse à la suite de mon Master. Je te remercie pour ta disponibilité tout au long de ce travail. Tu as su me soutenir et m'encourager lorsque cela était nécessaire, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Ta bonne humeur et ta bienveillance m'ont ensuite accompagné tout au long de ces 8 années. Merci de ta patience en ce qui concerne ma pratique du français, encore plus lorsqu'il s'agit du français issu d'une traduction de l'anglais !*

*Je tiens également à remercier **Alain G.** pour m'avoir donné l'opportunité de débiter cette aventure en m'accueillant en Master 2 au sein du laboratoire. La petite Ibérique vous remercie Alain pour votre vision scientifique toujours pertinente et pour vos blagues !*

***Frédo**, merci beaucoup pour ton travail minutieux et de qualité notamment lors du recueil des données de sérums, il m'a permis d'obtenir une sérothèque précieuse pour inspirer des bons sujets de recherche. Merci également pour les conseils que tu m'as apportés.*

***Alain M.**, merci pour ta disponibilité et d'avoir bien voulu répondre à toutes mes questions même lorsqu'il y en avait des tonnes, j'emmène dans mes bagages grâce à toi la technique du séquençage que tu m'as apprise et le souvenir de nos très nombreuses discussions politiques,*

Je tiens à remercier également Francis pour l'attention qu'il n'a cessé de porter à mon travail ainsi que pour toutes les publications qu'il m'a fait parvenir.

Je te remercie Philippe de m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire pour que je puisse y mener à bien ce projet que constitue une thèse. Je pense sincèrement que ce laboratoire est un cadre de qualité pour aider les étudiants à réussir. Tu n'as de cesse de trouver des solutions aux problèmes rencontrés et je te souhaite de continuer à faire grandir le laboratoire.

Merci à Laurent M de m'avoir offert l'opportunité de donner des cours et des TP aux étudiants de l'IRFTAB, j'ai pris beaucoup de plaisir lors de cette nouvelle expérience pour moi,

Un grand merci à l'ensemble de « La Pagés-Team », toujours autant motivés qu'il s'agisse de lancer une manip comme de chausser les baskets pour un peu de course à pieds. Merci à vous tous (Jean Christophe, Eric, Christine, Pascal, Vincent et Anne) d'avoir répondu à mes questions, de m'avoir conseillé pendant toutes ces années et d'avoir bien voulu me guider au moment d'utiliser de nouvelles techniques (Q-PCR, FACS...) Cela aura été très enrichissant d'avoir travaillé à vos côtés.

Jean-Christophe P, je te remercie pour l'attention que tu nous portes et ton aide, merci aussi de m'avoir fait découvrir ce qu'était l'humour d'un vrai médecin !

Romu, tu auras été un vrai Jédai à mes côtés. Dès le début j'ai senti que tu faisais parti du bon côté de la force, merci pour tes nombreux et précieux conseils et ta disponibilité, ah, et pour m'apprendre les jolis gros mots en français.

Nadine, merci de m'avoir guidé dans mon apprentissage douloureux de la gestion administrative à la « fac » (toujours pas mon fort) et de ton inquiétude pour tous tes étudiants en master. T'as toujours pris le temps de m'apprendre la culture ainsi que la langue française

Vincent, merci pour cette touche d'humour pointue, de tes imitationschhhh. Tu sais que je pourrais toujours chanter pour toi : ia ia ooh !!

Eric, merci pour ta disponibilité et ta pédagogie mais aussi pour nos discussions qui n'avaient rien de scientifiques,

Sara, merci pour ta précieuse aide, tu nous amène de la couleur au labo. Je suis ravie d'avoir travaillé avec toi

Martine, merci pour ta douce compagnie au long de toutes ces années, grâce à toi la mutagenèse dirigée a moins de secrets pour moi.

Antoine, merci pour ta disponibilité et ta prévenance. C'était très agréable de sentir que tu te préoccupais de savoir si tout allait bien pour moi

Aux travailleurs de Viale, Loïc, Audrey, merci pour votre bonne humeur

A tous les petits nouveaux de ces dernières années: Sandra, Vanessa, Mélanie, Charlotte, Anthony, Marion, Amélie, Claire, merci de votre sympathie, courage pour la suite !

A mes anciennes collègues du Master 2 : Anne Charlotte, Karine M, Elodie R, Noémie R, Gaël B, merci de tout ce bon temps partagé ensemble, j'en garde des souvenirs supers !

*Marie Splingard, mes premières pas sur la payasse ont été avec toi, merci
Merci au roi de l'informatique, Christophe, le gardien de l'ordre de la salle de réunion, Denys, à Manue B et à Jean-Christophe M, l'as du volant*

Enfin, un grand Merci à tous et chacun des membres de l'unité U966, de votre patience avec mon français primitif qui a évolué et évolue petit à petit, nos escapades pour un peu de course à pied, de canoé ou d'escalade ont été pour moi des supers moments, j'en garde vraiment de supers souvenirs !

Un grand merci au laboratoire de virologie du CHRU, merci pour votre sympathie et votre intérêt.

Merci au labo de microscopie électronique pour tous ces moments passés ensemble.

"La sensibilidad, el coraje, la solidaridad, la bondad, el respeto, la tranquilidad, los valores, la alegría, la humildad, la fe, la felicidad, el tacto, la confianza, la esperanza, el agradecimiento, la sabiduría, los sueños, el arrepentimiento y el amor para los demás y propio son cosas fundamentales para llamarse GENTE. Con gente como ésa, me comprometo para lo que sea por el resto de mi vida, ya que por tenerlos junto a mí, me doy por bien retribuido."

Mario Benedetti (Écrivain uruguayen 1920-2009)

Alexis, merci pour toutes les rigolades que tu as provoqué. Je garderais ta lettre de motivation avec moi.

Merci à toi Anne ma voisine de bureau, ma prof particulière de PCR en temps réel, ces années ont créé entre nous une amitié forte,

Merci Elodie pour ton accompagnement dès le début, je me souviens encore de nos « balades » à Grandmont pour les cours d'anglais,

Etienne, merci pour la découverte des musiques improbable et de ton amitié, je garde un beau souvenir de ton stage au labo.

Dear Eun-Yeung, thanks a lot for your kindness and for the importance you give to the others... don't change , It was a great pleasure to have a girl with a such optimism with us during these years.

Malika, je te remercie du fond du cœur pour ton accueil et l'amitié que tu m'as donné. J'ai encore en mémoire le bruit de tes talons qui me permettait de te reconnaître puisque je crois tu étais notre seule « scientifique en talons ».

Manue merci pour ton aide précieuse au laboratoire, arrivée en même temps que moi, tu m'auras accompagné tout au long de ces longues années de thèse, merci à toi pour tes talents multiples, ta bonne humeur et ta générosité,

Ma ptite Ion, de la Rochelle à Salamanque, on a baladé notre amitié qui a une valeur toute particulière pour moi, merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, ton écoute et tes conseils m'ont beaucoup aidé pendant toutes ces années.

Pauline, merci pour ton peps, ton naturel et ta joie de vivre que tu nous communique à chaque instant.

A Ma ptite Suzie, la mangeuse de pamplemousse la plus méticuleuse que je connaisse, merci pour ton organisation dans le labo (et que dans le labo, j'ai cru comprendre), merci surtout pour ton amitié pendant toutes ces années, profite bien de Jupiter

*Gracie Mile **Valentina** pour ta sympathie, ton naturel à toute épreuve et de m'avoir gardé parmi tes copines malgré ma grande consommation de jambon ·*

*A ma camarade pharmacienne, merci **Virginie** pour ta gentillesse et ton amitié*

*Merci à mes deux petites pipelettes préférées **Samia et Floriane**, j'ai encore dans la tête mes deux splendeurs **Cléopâtre et Princesse Léia** lors d'une soirée resté assez mémorable,*

*To my very goods friends **Tanawan and Wootichai**, thanks a lot for all these very good meal you were cooking in my home and for your happiness*

*A la bande de copains **MarsellOrléanoTourangelle**, merci à TOUS*

*A **Fabi, Rég et Marion**, merci à tous les trois pour votre soutien qui s'est traduit le plus souvent par de bonnes petites soirées chez vous où on se sent si bien· Merci pour votre chaleur (caliente) et votre générosité·*

A mis amigos, que desde la distancia me habéis acompañado y animado· A mis venezolanos, madrileños, asturianos, zaragozanos y por supuesto salmantinos

*Un grand merci à l'ensemble de la grande **famille Lecoq-Sureau** pour son soutien et son accueil· Christine, Dominique dès le début vous m'avez fait me sentir chez moi, ça m'a beaucoup aidé et m'a donné la force de mener à bien cette thèse Juliet et Val, mes sœurettes adoptives, vous avez été là quand j'en ai eu besoin*

***Camille**, merci pour tes conseils et corrections aussi bien pour cette thèse comme pour l'article· Merci aussi pour la bonne cuisine que tu nous prépares et pour ton aide aux travaux dans la maison,*

A mis padres y a mi hermano, Vuestra ayuda e interés han sido un buen motor a pesar de las distancias Estoy muy orgullosa contar con una familia como la nuestra, gracias por haberme apoyado y estar siempre ahí·

*Y a ti, claro, **mi Benito**, comment te remercier pour tout ce que tu me donnes à chaque moment· Ton soutien sans limites tout au long de ma thèse*

a été essentiel pour moi. Tu m'aides toujours à prendre de recul et voir les choses plus positives, plus faciles, même dans les moments les plus difficiles. Merci pour ça et pour tout le reste (que no es poco !).

Résumé

Chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C, le haut niveau de réplication combiné à l'absence d'activité correctrice de l'ARN polymérase est responsable d'une grande variabilité génétique, comme en témoigne la présence de multiples variants viraux (quasi-espèces) co-infectant un même individu. La génération continue de variants viraux chez l'hôte infecté est un des mécanismes contribuant à l'échappement du VHC au système immunitaire. Les glycoprotéines E1 et E2 sont exposées à la surface de la particule virale et sont hautement variables. Elles jouent un rôle essentiel dans l'entrée virale et sont les cibles principales des anticorps neutralisants. Après la contamination, seulement 30% des patients infectés guérissent spontanément.

Le rôle de la réponse neutralisante lors de l'élimination virale n'est pas encore complètement élucidé. Nous avons souhaité explorer les mécanismes liés à la réponse humorale, menant à la guérison spontanée. Le but de ce travail était (i) d'examiner la diversité et l'évolution précoce des cibles principales des anticorps neutralisants (les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) en cas de guérison spontanée rapide (ii) d'analyser comparativement l'infektivité des différents variants du VHC présents aux stades précoces de l'infection (iii) d'explorer la capacité neutralisante des anticorps des patients étudiés vis-à-vis des variants majoritaires et de plusieurs variants minoritaires portant un profil mutationnel particulier.

Nous avons sélectionné deux patients ayant développé une hépatite aigue C suivie d'une guérison spontanée très rapide. Pour le premier cas, un segment génomique codant pour l'intégralité des gènes E1 et E2 a été amplifié à partir d'un sérum collecté 17 jours après le pic de transaminases. Pour le deuxième cas, les gènes codant pour E1 et E2 ont été amplifiés à partir de deux sérums, l'un collecté au moment du pic de transaminases (t1) et l'autre 17 jours plus tard (t2). Trente trois clones ont été séquencés. De façon intéressante, un des variants minoritaires portait deux substitutions par rapport au variant majoritaire, incluant une mutation en position 645 située au niveau du onzième site de glycosylation de E2, théoriquement très conservé. Quarante deux clones issus du prélèvement t1 et 39 du prélèvement t2 ont été séquencés. Comme le montre l'analyse phylogénétique, il existe une différenciation génétique significative entre les variants circulants à ces deux temps distants seulement de 17 jours. Un résidu situé dans la région hypervariable HVR3 est soumis à une forte pression de sélection positive.

Afin d'explorer la capacité d'entrée de ces variants dans des cellules cibles et leur aptitude à être neutralisés, nous avons produit des pseudo-particules rétrovirales (HCVpp) portant un gène rapporteur (gène de la luciférase) et les enveloppes de différents variants. Pour le premier cas, il s'agissait des enveloppes du variant majoritaire et du variant portant la mutation N₆₄₅S. Pour le deuxième cas, il s'agissait des enveloppes portées par le variant majoritaire et par neuf variants minoritaires. Grâce au système rapporteur, l'entrée de ces pseudoparticules dans des cellules cibles (HuH7) a pu être étudiée. Pour le premier cas, l'infektivité du variant majoritaire était la plus élevée ;

celle du variant portant la mutation N₆₄₅S était deux fois moindre. La restauration du site E2N11 par mutagenèse dirigée a permis de rétablir le niveau d'infectivité, au même niveau que le variant majoritaire. Pour le deuxième cas, la différenciation génétique des variants entre P2t1 et P2t2 était associée à une baisse d'infectivité, un des deux variants majoritaires à t2 étant 5 fois moins infectieux que le majoritaire à t1.

Pour le premier patient, une réponse neutralisante autologue était détectable précocement et atteignait un maximum entre le deuxième et le troisième mois suivant le pic de transaminases. Cette réponse persistait dans le temps, étant encore détectable au trentième mois. Pour le deuxième patient, des anticorps neutralisants vis-à-vis du variant majoritaire isolé très précocement étaient détectés dans le sérum le plus précoce (prélevé 4 jours après le pic de transaminases) et dans les sérums plus tardifs (prélevés jusqu'au treizième mois). Le titre de ces anticorps atteignait un maximum entre le cinquième et sixième mois après l'épisode aigu.

Lors de l'exploration de ces deux cas de guérison spontanée, nous avons montré que la réponse neutralisante était d'apparition précoce et persistait même après l'élimination virale : 3 ans pour le premier cas et au moins un an pour le second. Ces observations nous questionnent par rapport au rôle éventuel que pourrait jouer ces anticorps dans les cas de recontamination.

Mots-clés : Virus de l'hépatite C, neutralisation, autologue, évolution

Abstract

The high replication rate together with the absence of any proofreading function of the viral RNA-dependent RNA polymerase is responsible for the large intra-patient genetic variability of Hepatitis C virus in infected individuals. Accordingly, the extent of viral diversification of HCV strains in single HCV-positive individual increases significantly with time, resulting in the development of HCV quasispecies. The continuous emergence of viral variants in the infected host is one of the mechanisms explaining the escape of HCV from immune survey. The glycosylated envelope proteins E1 and E2 are exposed at the surface of the viral particle, and are subject to high rates of mutation. They play an essential role in viral entry and are major targets for neutralizing antibodies. After initial exposure to HCV, only 30% of infected individuals recover spontaneously.

The role of the neutralizing antibody response in pathogenesis and viral clearance after HCV infection is not fully understood. We investigated the mechanisms linked to the humoral response and leading to early HCV clearance and spontaneous recovery. The purpose of this work was: (i) to explore the diversity and the early genetic evolution of the HCV envelope glycoproteins E1 and E2, and the infectivity spectrum of isolated variants and (ii) to analyze the ability of the autologous neutralizing response to control these variants and thus HCV infection.

We selected two patients who had developed an acute HCV infection. For the first case, the segment encoding E1 and E2 was successfully amplified from a sample (P1t2) collected from 17 days after the ALT peak. For the second case, the segment encoding E1 and E2 was amplified from two samples collected at the time of the ALT peak and 17 days later.

Thirty-three clones were successfully sequenced. Five clones were a major variant (P1t2c16). Interestingly, A minor variant (P1t2c28, 1/33) bore two substitutions relative to the major variant, including one at position 645 corresponding to the well-conserved E2-N11 glycosylated site. Forty-one P2t1 clones and 39 P2t2 clones were sequenced. As shown by the phylogenetic analysis. This diversity was structured between the two time samples (17 days apart) with a highly significant genetic differentiation. One site located in E2-HVR3 was submitted to a strong evidence for positive selection.

In order to explore the consequences of mutations on infectivity and neutralization, HCVpp were produced with representative E1 and E2 sequences : the major variant and a minor one bearing the N₆₄₅S mutation leading to the loss of the E2-N11 glycosylation site for case 1, and the major variants as well as 9 minor variants for case 2. For the first case, pseudoparticles bearing the envelope of the major variant were the most infective in Huh7. The minor variant in which envelope had mutation N₆₄₅S at the N11 glycosylation site had half the infectivity of the major variant. Rapid evolution was associated with a loss of infectivity of variants between the two times (P2t1 et P2t2). At t2, the prevalent variant was significantly less infectious (5 fold) than that of its counterpart at t1.

For the first case, the maximum neutralizing activity was for serum collected between two and three months post ALT peak, and the activity was still detectable in serum collected after 30 months. For the second case, autologous neutralizing activity against HCVpp bearing the envelope of the major variant isolated at the ALT peak was detected in every serum collected between 4 days and 13 months after. Further titration experiments showed a gradual increase of neutralization activity over time with a maximum 5 to 6 months after the ALT peak. This was associated with substantial evolution of the E1 and E2 proteins corresponding to a loss of infectivity.

We have shown that the neutralizing response was detectable at early stages of primoinfection and was sustained beyond the time at which the virus was cleared: 3 years for the first case, and at least 1 year for the second case. These observations raise interesting questions about the role of such antibodies in case of re-exposure

Key words: Hepatitis C virus, neutralization, autologous, evolution, diversity

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CD81 : la tétraspanine

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

CLDN : claudine

CMV : cytomégalovirus

CTL : cellules T cytotoxiques

DTM : domaine trans-membranaire

DO : densité optique

EGFR : récepteurs du facteur de croissance épidermique

E1 : Glycoprotéine d'enveloppe E1

E2 : Glycoprotéine d'enveloppe E2

GAG : glycosaminoglycanes

HEK : « Human Embryonic Kidney », lignée cellule épithéliale

HVR : « Hyper Variable Region », région hypervariable de l'enveloppe du VHC

IgG : Immunoglobulines G

LDL : « Low Density Lipoprotein », lipoprotéines de base densité

L-SIGN et

LB : Luria Beltrani

LBA : Luria Beltrani-Agar

min : minutes

mL: millilitres

MLV: Virus de la leucémie murine

ng : nanogrammes

NK : natural killer

nm : nanomètre

NS 2-5 :

Nt(s) : nucléotides (s)

OCLN : Ocludine

OST : oligosaccharytransférase

PCR : Polymerase Chain Reaction,

p.p.i. : préparation pour injectable
RE : réticule endoplasmique
Réf. : référence
REL : Random Effect Likelihood
RIG I : ARN hélicase (Retinoic acid Inductible Gen I)
RLU : unité relative de luminescence (Relatif Luminescence Unit)
RTK : récepteurs à tyrosine kinase
SR-BI : récepteur « scavenger »
s : secondes
SR-BI : scavenger receptor class B type I
sE2 : forme soluble de E2
TBS : Tris Buffered Saline
TG : tampon tris glycérol
TG-SDS 10X
TLR : Toll like receptor
TNF :
UTR : (*untranslated regions*), région non codante
U : Unités
V : volt
VHC : virus de l'hépatite C
WB : western blot
 μ M : micro molaire

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	9
Abstract	11
Liste des abréviations	13
Table des matières	15
Liste des tableaux	21
Liste des figures	23
Liste des annexes.....	26
INTRODUCTION.....	27
GENERALITES	30
I. Le virus de l'hépatite C	31
I.1. Découverte, Taxonomie	31
I.2. Structure de la particule virale	31
I.3. Organisation du génome et protéines virales	32
I.3.1 Régions non codantes.....	34
I.3.2 La région codante.....	35
I.4. Cycle viral	39
I.5. Diversité du VHC.....	41
I.5.1 Origine de la variabilité génétique	41
I.5.2 Génotypes.....	42
I.5.3 Quasi-espèces	45
I.5.4 Les virus recombinants.....	46
II. Epidémiologie de l'infection par le VHC	48
II.1. Données de prévalence et d'incidence	48
II.1.1 Modes de transmission	48
II.2. Histoire naturelle de l'infection.....	50
III. Entrée du VHC	53
III.1. Partenaires cellulaires.....	54
III.1.1 Molécules d'attachement.....	54
III.1.2 Récepteurs	56
III.2. Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	62
III.2.1 Biogenèse	62
	15

III.2.2	Maturation	63
III.2.3	Assemblage et repliement	69
III.2.4	Principaux domaines des protéines E1 et E2	70
III.2.5	Résidus impliqués dans les mécanismes d'entrée virale	76
III.3.	Modélisation de l'entrée du VHC	78
III.3.1	Attachement	78
III.3.2	Internalisation.....	78
III.3.3	Fusion.....	78
IV.	Contrôle de l'infection par le système immunitaire	80
IV.1.	Réponse immunitaire innée.....	80
IV.2.	Réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	82
V.	Réponse humorale neutralisante.....	84
V.1.	Modèles et principes d'étude de la réponse anticorps.....	84
V.1.1	Modèles animaux	84
V.1.2	Modèle d'infection <i>in vitro</i>	85
V.1.3	Tests de neutralisation.....	86
V.2.	Les cibles des anticorps neutralisants.....	86
V.2.1	Epitopes linéaires	87
V.2.2	Epitopes conformationnels.....	88
V.3.	Anticorps neutralisants et contrôle de l'infection	89
V.3.1	Rôle dans la chronicité	91
V.3.2	Rôle dans la réinfection du greffon	93
	OBJECTIFS DU TRAVAIL	95
	PATIENTS, MATERIELS ET METHODES	97
VI.	Sélection et présentation des patients étudiés	98
VI.1.	Présentation du cas du patient 1 (P1)	99
VI.2.	Présentation du cas du patient 2 (P2)	99
VII.	Sélection de sérums témoins	100
VII.1.	Sérums de donneurs de sang	100
VII.2.	Sérums de patients avec une activité anticorps dirigée contre la région HVR1	100
	MATERIEL.....	102
VIII.	Plasmides et vecteurs utilisés pour le clonage des gènes d'intérêt	103
VIII.1.	Vecteur navette (pGEM®T Easy Vector, Promega).....	103

VIII.2.	Vecteurs d'expression	103
VIII.2.1	pcDNA 3.1(+), Invitrogen.....	103
VIII.3.	Autres vecteurs d'expression	104
VIII.3.1	pTM1 _{E1/E2}	104
VIII.3.2	pTGLuc	104
VIII.3.3	pMN _{gag-pol}	104
VIII.3.4	pCMV-Ampho	105
IX.	Lignées cellulaires.....	106
IX.1.	Lignée 293-T	106
IX.2.	Lignée Huh-7.....	106
X.	Anticorps utilisés.....	107
X.1.	Anticorps primaires	107
X.2.	Anticorps secondaires	108
METHODES	109
XI.	Vérification des plasmides utilisés.....	110
XI.1.	PCDNA3.1+	110
XI.2.	pTM1 _{E1/E2}	110
XI.3.	pMN _{gag-pol}	110
XI.4.	pCMV-Ampho	110
XI.5.	pTGLuc	110
XII.	Amplification des gènes E1 et E2 du VHC.....	111
XII.1.	Extraction de l'ARN viral	111
XII.2.	Réaction de Transcription inverse.....	111
XII.3.	Amplification génique.....	111
XII.3.1	Cas du patient 1 (P1, souche de gt 1b)	112
XII.3.2	Cas du patient 2 (P2, souche de gt 3a)	113
XII.4.	Analyse des produits issus de l'amplification génique	113
XII.5.	Clonage de l'ADN amplifié dans un vecteur plasmidique.....	114
XII.5.1	Préparation de bactéries compétentes	114
XII.5.2	Transformation de bactéries compétentes	114
XII.5.3	Sélection des clones recombinants.....	115
XIII.	Séquençage des gènes E1/E2	116
XIII.1.	Séquençage et analyse de séquences nucléotidiques.....	116

XIII.2.	Analyse des sites de glycosylation	117
XIII.3.	Analyse de l'évolution génétique des variant viraux et de la pression sélection exercée sur les glycoprotéines E1/E2 (cas du patient P2).....	118
XIV.	Introduction par mutagenèse dirigée de mutations dans les gènes E1E2 clonés dans l'enveloppe.....	120
XV.	Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt	122
XV.1.	Linéarisation du plasmide pcDNA3.1(+)	122
XV.2.	Ligation de l'insert d'intérêt dans le plasmide pcDNA3.1(+)	122
XV.3.	Transformation de bactéries compétentes pour l'amplification du plasmide	122
XV.3.1	Vérification de la présence et du sens d'intégration de l'insert	122
XV.4.	Préparation d'ADN plasmidique.....	123
XV.4.1	Séquençage.....	123
XVI.	Production des pseudoparticules rétrovirales.....	125
XVI.1.	Transfection des cellules 293T.....	125
XVI.1.1	L'agent transfectant.....	125
XVI.1.2	Protocole de co-transfection.....	126
XVI.1.3	Récolte des surnageants de culture.....	127
XVI.2.	Vérification de la production.....	127
XVI.2.1	Quantification de l'ARN de la luciférase	127
XVI.2.2	Etude de l'expression des protéines E1/E2 par Western-Blot.....	128
XVII.	Etude de l'entrée dans des cellules hépatiques des HCVpp portant les enveloppes des variants isolés.....	131
XVIII.	Etude de la sensibilité à la neutralisation autologue des HCVpp produites.....	132
XVIII.1.	Titrage des anticorps neutralisants dans les échantillons du patient N° 2.....	132
RESULTATS	133
XIX.	Cas du patient 1	134
XIX.1.	Analyse des produits issus de l'amplification génique	134
XIX.1.1	Contrôle de l'amplification des gènes E1/E2 du VHC	134
XIX.1.2	Sélection des clones recombinants et analyse de leurs séquences	134
XIX.2.	Analyse des sites de N-glycosylation.....	136
XIX.2.1	Sur la glycoprotéine E1	136
XIX.2.2	Sur la glycoprotéine E2	136

XIX.3.	Récapitulatif des variants et des mutants choisis pour la production des HCVpp	
	137	
XIX.4.	Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt	138
XIX.4.1	Quantification de l'ARN de la luciférase	138
XIX.4.2	Vérification de l'expression des protéines de E1E2 à la surface des HCVpp produites	139
XIX.5.	Capacité d'entrée des HCVpp portant différentes enveloppes dérivées des variants isolés du patient 1	140
XIX.6.	Etude de la réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c16).....	141
XIX.7.	Etude de la réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c28).....	142
XX.	Cas du patient 2	143
XX.1.	Analyse des produits issus de l'amplification génique	143
XX.1.1	Contrôle de l'amplification des gènes E1/E2 du VHC	143
XX.1.2	Sélection des clones recombinants et analyse de leurs séquences	143
XX.2.	Evolution entre P2t1 et P2t2 de la population virale.....	147
XX.3.	Etude des sites soumis à pression de sélection.....	148
XX.1.	Analyse des sites de N-glycosylation.....	149
XX.1.1	Sur la glycoprotéine E1 :.....	149
XX.1.2	Sur la glycoprotéine E2	149
XX.2.	Récapitulatif des variants et des mutants choisis pour la production des HCVpp	150
XX.3.	Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt	151
XX.3.1	Quantification de la production d'ARN codant pour le gène <i>Luc</i>	151
XX.3.2	Vérification de l'expression des protéines de E1E2 à la surface des HCVpp produites	152
XX.4.	Etude de l'entrée des différentes pseudoparticules dans des cellules Huh7	153
XX.5.	Réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant les enveloppes des variants majoritaires	155
XX.5.1	Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2t1c43-HCVpp.....	155
XX.5.2	Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2T2c6-HCVpp.....	157
XX.5.3	Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2T2c6-HCVpp.....	158

DISCUSSION	159
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	168
Résumé	204
Abstract	204

Liste des tableaux

Tableau 1: Schéma des recombinaisons du VHC	47
Tableau 2: Nature des acides aminés (AA) influençant l'efficacité de la N-glycosylation.....	64
Tableau 3 Pourcentage de conservation des sites potentiels de N-glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC.	64
Tableau 4 Pourcentage de conservation des sites potentiels de N-glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHC.	65
Tableau 5: Récapitulatif des travaux effectués sur le rôle des N-glycanes situés sur E1 et E2	67
Tableau 6: Effet des mutations sur les N-glycanes associés à la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHC.	67
Tableau 7 : Effet des mutations sur les N-glycanes associés à la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC.	68
Tableau 8: Récapitulatif de mutations impliquées dans l'échappement à la neutralisation	93
Tableau 9 : Caractéristiques biochimiques et virologiques des patients P1 et P2.....	98
Tableau 10 : Résultats virologiques des sérums témoins HVR1+	101
Tableau 11: Descriptif des anticorps monoclonaux utilisés.....	107
Tableau 12: Descriptif des anticorps secondaires utilisés, couplés à la peroxydase.....	108
Tableau 13: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes E1et E2 par PCR nichée (cas P1).....	112
Tableau 14: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes E1E2 par PCR nichée (cas P2).....	113
Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage des gènes E1/E2 ...	117
Tableau 16: Caractéristiques des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée	121
Tableau 17: Caractéristiques des amorces utilisées pour la vérification de la présence et du sens de l'insert E1E2	123
Tableau 18: Conditions de transfection : description des mélanges réactionnels utilisés.....	126
Tableau 19: Description des amorces utilisées pour l'amplification du gène <i>Luc</i> « <i>Firefly</i> »	128
Tableau 20 : Récapitulatif des mutations présentes sur les séquences d'enveloppe des variants clonés en comparaison avec le variant majoritaire P1t2c16	135
Tableau 21: Sites de glycosylation prédits dans la glycoprotéine d'enveloppe E2 des variants issus du prélèvement P1t2.	136

Tableau 22 : Récapitulatif des variants et des mutants étudiés pour leur capacité d'entrée dans des cellules Huh7	137
Tableau 23: Récapitulatif des différentes mutations présentes au niveau des glycoprotéines d'enveloppe des variants issus des prélèvements P2t1 et P2t2 en comparaison à la séquence majoritaire de P2t1 (P2t1c43).....	144
Tableau 24: Description des sites de glycosylation dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 des variants issus du patient 2.....	149
Tableau 25: Description des sites de glycosylation dans la glycoprotéine d'enveloppe E2 des variants issus du patient 2.....	150
Tableau 26 : Récapitulatif des variants étudiés pour la capacité d'entrée des HCVpp correspondantes dans les cellules Huh7	151

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la particule virale, une lipo-viro-particule	32
Figure 2 : Organisation génomique du VHC et maturation de la polyprotéine	33
Figure 3 : Schématisation du cycle viral dans un hépatocyte non polarisé.....	41
Figure 4 Répartition des génotypes du VHC en Europe	43
Figure 5 Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC.	44
Figure 6: Schématisation de l'histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	51
Figure 7: Représentation schématique de l'évolution des marqueurs biochimiques et virologiques lors de la guérison spontanée d'une infection par le VHC (A) ou lors de l'infection chronique (B).....	52
Figure 8: Schéma d'entrée du VHC dans les hépatocytes polarisés	53
Figure 9: Interaction virus-cellule hôte	56
Figure 10: Biogenèse et clivage E1 et E2 du VHC	62
Figure 11 Représentation des sites potentiels de N-glycosylation sur E1 et E2 et ses possibles rôles.	65
Figure 12 : Représentation schématique de la glycoprotéine E2 du VHC.....	71
Figure 13: Réorganisation des DTM de E1 et E2.	73
Figure 14 : Représentation schématique des sites fonctionnels de la glycoprotéine E2	77
Figure 15 : Atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte par le VHC	81
Figure 16: Représentation schématique de l'évolution de la réponse immune à médiation cellulaire après une primo-infection par le VHC.....	83
Figure 17: Représentation schématique des points d'action des anticorps neutralisants du VHC.	87
Figure 18: Représentation des cibles principales des Ac neutralisants sur la glycoprotéine E2	89
Figure 19: Représentation schématique du vecteur de clonage pGEM®T Easy Vector, Promega.....	103
Figure 20: Représentation schématique du vecteur d'expression pcDNA 3.1(+), Invitrogen	104
Figure 21: Représentation schématique du vecteur pMNgag-pol.....	105
Figure 22: Représentation schématique du vecteur pCMV-Ampho	105
Figure 23: Représentation schématique de la région du génome du VHC amplifié à partir du sérum P1t2.....	112

Figure 24: Représentation schématique de la région du génome du VHC amplifié à partir du sérum P2t1 et P2t2.....	113
Figure 25: Représentation schématique de la stratégie de mutagenèse dirigée par PCR interne	120
Figure 26: Représentation de la séquence partielle de l'enveloppe du clone P1c28c16 et de la localisation exacte de la position du nucléotide 1236 à muter.	121
Figure 27: Représentation de la séquence partielle de l'enveloppe du clone P1t2c16 et la localisation exacte de la position mutée dans le nucléotide 2275 à muter.	121
Figure 28 : Représentation schématique du protocole de production des différentes pseudoparticules rétrovirales.....	124
Figure 29: Analyse électrophorétique des produits issus de l'amplification par PCR des gènes E1 et E2 du VHC dans le cas du patient 1	134
Figure 30 : Droite d'étalonnage présentant le nombre de copies du plasmide pTGLuc à partir de dilutions successives (10^{10} , 10^8 , 10^6 , 10^4 et 10^2)	138
Figure 31: Nombre de copies d'ADNc par microlitre de surnageant, du gène de la Luciférase <i>Firefly</i> obtenues lors de la production des six pseudoparticules produites (cas du patient P1).	138
Figure 32: Alignement des séquences des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux A4 et H111 avec les séquences de la souche H77 et celles des variants P1t2c16 et P1t2c28.....	139
Figure 33: Capacité d'entrée des HCVpp portant les glycoprotéines E1E2 correspondants au variant majoritaire, à un variant minoritaire sélectionné et à deux mutants.	140
Figure 34 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps contre des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire isolé 17 jours après le pic d'ALAT chez le patient 1.....	141
Figure 35 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps contre des HCVpp portant l'enveloppe d'un variant minoritaire isolé 17 jours après le pic d'ALAT chez le patient 1 et muté dans site de N-glycosylation E2N11 (P1t2c28)	142
Figure 36: Photographie du gel d'électrophorèse de l'ADN issu de l'amplification par PCR des gènes E1 et E2 du VHC dans le cas du patient 2, prélèvements P2t1 et P2t2.	143
Figure 37 : Récapitulatif des variants de l'enveloppe E1/E2 isolés dans les deux prélèvements sériques contemporains des phases précoces de la primo-infection (P2t1 et P2t2).	147

Figure 38 Arbre montrant la répartition génétique phylogénétique des variants identifiés à t1 et t2.....	148
Figure 39 : Représentation de la pression-sélection sur chaque résidu en aa des glycoprotéines E1 et E2.	148
Figure 40: Nombre de copies d'ADNc du gène de la Luciférase <i>Firefly</i> obtenues par microlitre de surnageant lors de la production des douze pseudoparticules (cas du patient P2)	152
Figure 41: Alignement des séquences des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux A4 et H111 avec les séquences de la souche H77 et des variants issus de P2.....	152
Figure 42: Capacité d'entrée des HCVpp portant les glycoprotéines E1E2 correspondants aux variants majoritaires et à des variants minoritaires isolés dans les prélèvements P2t1 et P2t2.....	154
Figure 43 : Analyse au cours du temps de la réponse neutralisante autologue dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire isolé au moment du pic d'ALAT (cas du patient 2).....	155
Figure 44 : Analyse de la réponse de neutralisation autologue contre la pseudoparticule portant l'enveloppe du variant majoritaire P2t1c43.....	156
Figure 45 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe d'un des variants majoritaires isolée dans le prélèvement P2t2.....	157
Figure 46 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe d'un des variants majoritaires isolée dans le prélèvement P2t2.....	158

Liste des annexes

Annexes.....	202
--------------	-----

INTRODUCTION

L'infection par le VHC est souvent asymptomatique, évoluant dans environ 70% des cas vers la chronicité. L'intensité de l'hépatite chronique active conditionne le risque de développements d'une cirrhose. Globalement, l'incidence de la cirrhose est de l'ordre de 20% après dix ans d'évolution de l'infection. Les malades ayant une cirrhose virale C ont un risque élevé de développer un carcinome hépatocellulaire.

L'éradication du virus de l'hépatite C d'un organisme infecté, qu'elle soit sous l'effet d'un traitement ou bien spontanée, serait influencée par la combinaison de facteurs d'hôte (âge, sexe, système immunitaire) et de facteurs liés au virus lui-même (génotype, charge virale initiale).

Le rôle de la réponse à médiation cellulaire dans l'éradication du VHC a été largement décrit (Paragraphe IV.2). Par contre, l'appréciation du rôle exact de l'immunité humorale dans la pathogenèse ou la clairance virale est plus restreinte (Paragraphe V.3). Des travaux, déjà anciens, avaient suggéré la présence d'anticorps anti-VHC neutralisants dans le sérum des patients infectés et l'émergence de mutants d'échappement. Initialement, l'identification des cibles moléculaires de ces anticorps a été approchée notamment par des expériences de neutralisation à l'aide de sérums hyper-immuns lors d'infections expérimentales. Désormais, plusieurs épitopes cibles des Ac neutralisants ont été décrits dans les glycoprotéines E1E2 (Paragraphe V.2).

Certains travaux ont mentionné la présence de titres en anticorps anti-E2 élevés chez des patients présentant un bas niveau de réplication virale, suggérant le rôle de la réponse anti-enveloppe dans le contrôle de l'infection par le VHC (K G Hadlock et al. 2001). De façon théorique, ces anticorps pourraient neutraliser la pénétration du virus dans ces cellules cibles, contribuant ainsi à l'élimination des cellules infectées par la cytotoxicité dépendante des anticorps ou être opsonisants pour contribuer à l'élimination macrophagique. Récemment, de nouveaux modèles (HCVpp et HCVcc) ont été développés, permettant l'étude des phénomènes de neutralisation *in vitro* (Paragraphe V.1.2).

Chez le chimpanzé et l'homme, le développement de la réponse neutralisante coïnciderait avec celui de la réponse humorale anti-E2 et anti-E1 (C. Logvinoff et al. 2004). La réponse neutralisante hétérologue a pu être détectée à des titres élevés chez la majorité des porteurs chroniques. Par contre, cette réponse hétérologue a été peu fréquemment décrite lors de l'hépatite C aiguë et apparaît retardée (B. Bartosch et al. 2003; Thomas von Hahn et al. 2007). Plusieurs auteurs ont montré que l'éradication du VHC n'était pas systématiquement

associée à la présence d'une activité neutralisante hétérologue (C. Logvinoff et al. 2004; J. C. Meunier et al. 2005).

Les analyses de la réponse hétérologue, dirigées contre des souches prototypes et non contre les variants circulant chez les patients infectés, sont limitées. Elles ne permettent pas d'élucider clairement les mécanismes conduisant à l'éradication virale ou à l'échappement immunitaire, contrairement à celles portant sur l'étude de la réponse autologue. Celle-ci se définit comme le développement chez un individu d'anticorps neutralisants dirigés contre les variants de la quasi-espèce présente chez un individu infecté.

Le présent travail de thèse s'inscrit dans une approche d'amont visant à contribuer à une meilleure compréhension du rôle des anticorps neutralisants dans l'histoire naturelle de l'infection par le VHC. Dans la première partie, nous exposerons des généralités introductives sur le virus de l'hépatite C et aborderons plus en détail les mécanismes proposés dans l'entrée virale et les éléments concernant la réponse immunitaire dirigée contre le VHC. Nous décrirons ensuite le matériel biologique et la méthodologie utilisés. Dans la troisième partie, nous exposerons alors les résultats expérimentaux obtenus puis les discuterons avant d'aborder les perspectives de ce travail.

L'ensemble des résultats de ce travail fait l'objet d'une publication soumise (Annexe).

GENERALITES

I. Le virus de l'hépatite C

I.1. Découverte, Taxonomie

Les tests diagnostic développés dans les années 70 pour la détection des infections par les virus des hépatites A et B chez l'homme, permirent de se rendre compte que la majorité des hépatites post-transfusionnelles n'étaient pas dues à ces virus (S M Feinstone et al. 1975). En utilisant le chimpanzé comme modèle expérimental, il a été montré l'existence d'un agent transmissible par voie parentérale, responsable des hépatites dites « non-A, non-B » (H J Alter et al. 1978). L'identification moléculaire de cet agent, nommé virus de l'hépatite C (VHC), fut réalisée par clonage et séquençage de son génome (Patrizia Farci 2002). L'analyse de la séquence obtenue, a permis de classer le VHC au sein de la famille des *Flaviviridae*, due à une organisation génomique identique à celle du génome des genres *Flavivirus* et *Pestivirus* appartenant également à cette famille (R. H. Miller & R H Purcell 1990). Le VHC est alors classé dans un nouveau genre : le genre *Hepacivirus*.

I.2. Structure de la particule virale

Le VHC est connu depuis plus de deux décennies, mais la structure et la morphogénèse de la particule virale restent incertains, même depuis l'existence d'un système de réplication *in vitro* (Takaji Wakita et al. 2005). Les particules *virales* n'ont jamais été observées avec certitude en microscopie électronique.

Les premières descriptions de pseudoparticules ont été obtenues à partir de cultures de cellules lymphoïdes humaines infectées, d'hépatocytes de chimpanzé ou d'hépatocytes fœtaux humains. Shimizu *et al* (Y. K. Shimizu et al. 1996) ont observés par microscopie électronique des pseudoparticules virales de 50 nm de diamètre dans les vésicules cytoplasmiques de lignées cellulaires T et B. D'après ces observations, et par analogie avec les autres virus de la famille *Flaviviridae*, la particule virale (55 à 65 nm de diamètre) serait enveloppée, contenant probablement une nucléocapside icosaédrique de 30nm de diamètre. Cette dernière renfermerait le génome viral constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire (Gastaminza et al. 2010) (Figure 1).

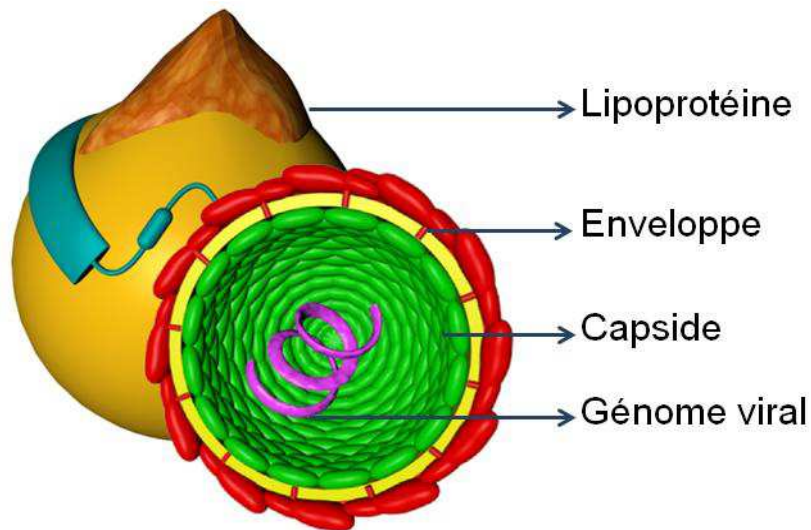


Figure 1: Représentation schématique de la particule virale, une lipo-viro-particule

D'après (C.-I. Popescu & Jean Dubuisson 2010)

Par ailleurs, plusieurs études réalisées à partir de sérums de patients infectés ont conduit à l'identification de plusieurs structures de densité variable contenant le génome viral (Andre et al. 2002; Thomssen et al. 1993; D. Bradley et al. 1991). La faible densité générale des particules virales est due à leur association avec des lipoprotéines, pour former ce qu'on appellei Lipo-Viro-Particules (LVP). Il existe des particules de faible densité (1,03 à 1,08 g/mL) et de haute densité (1,17 à 1,25 g/mL) (Andre et al. 2002). Les particules de faible densité se trouvent associés aux VLDL ou LDL et sont plus infectieuses que celles de plus haute densité associées à des IgG (Andre et al. 2002; M. Hijikata et al. 1993; D. Bradley et al. 1991). Elles contiennent, en plus de l'ARN et des protéines virales, les lipoprotéines ApoB et ApoE. Il a également été montré que la production de VHC par des cellules hépatocytaires dépend de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL, suggérant que les particules du VHC seraient liées aux VLDL durant leur assemblage et sécrétées avec elles (Gastaminza et al. 2008; D. M. Owen et al. 2009).

I.3. Organisation du génome et protéines virales

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire linéaire et à polarité positive, d'environ 9600 nucléotides (nts) (Figure 2). Il porte un cadre de lecture principal, encadré par deux régions non codantes situées aux extrémités 5' et 3' (Tan et al., 2002). La traduction de ce cadre ouvert de lecture aboutit à la synthèse d'une polyprotéine précurseur unique d'environ 3000 acides aminés (aa). Un processus de maturation co- et post-traductionnelle

permet le clivage de la polyprotéine pour donner naissance à des protéines structurales (capside et protéines d'enveloppe E1 et E2), la protéine p7 et les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sous l'action combinée de protéases cellulaires et virales.

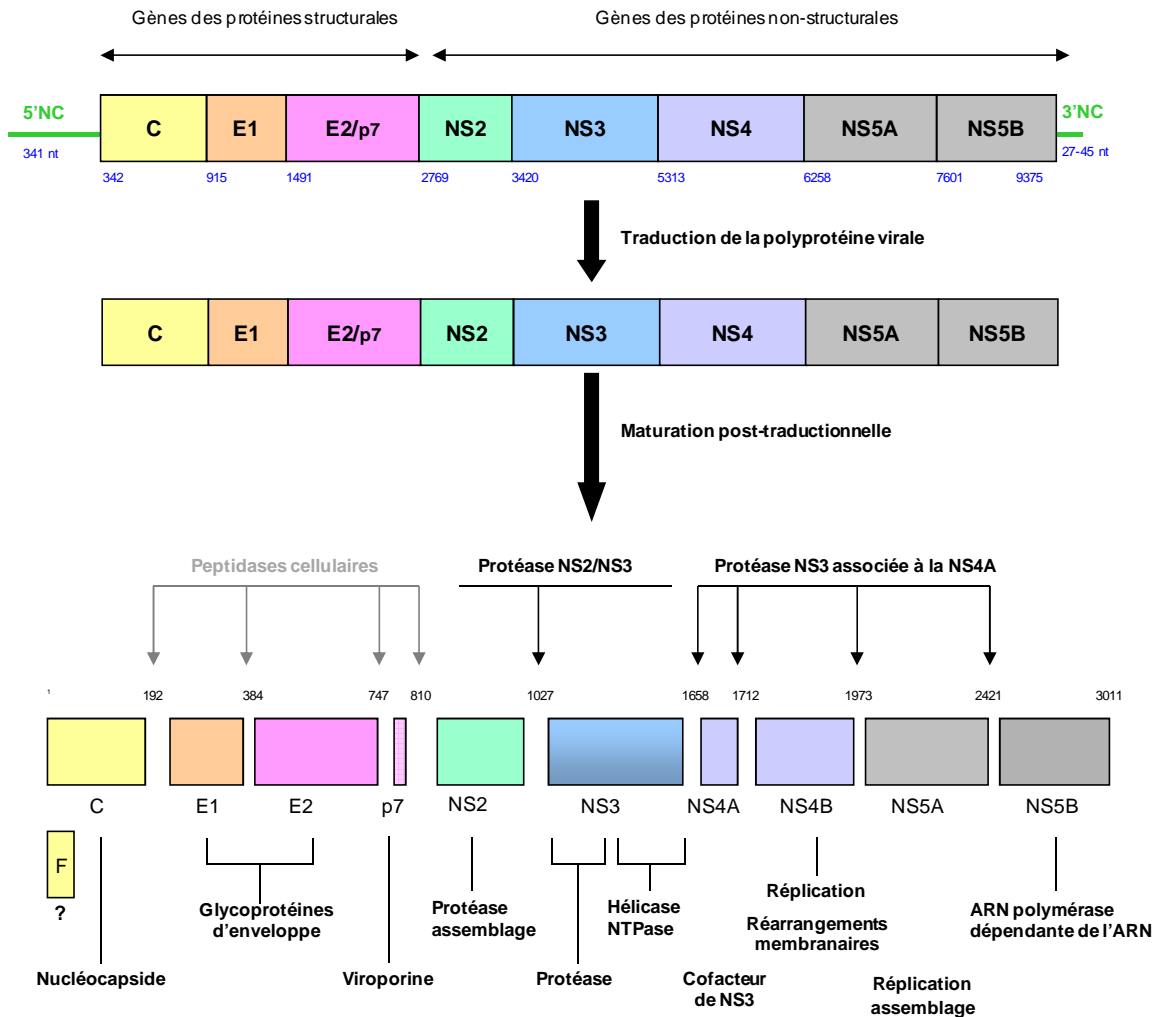


Figure 2 : Organisation génomique du VHC et maturation de la polyprotéine

Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive. Deux régions non codantes, situées aux extrémités 5' et 3' du génome et nommées respectivement 5'NC et 3'NC, encadrent la partie codante constituée d'un cadre unique de lecture. La polyprotéine (environ 3000 aa) est secondairement clivée en protéines structurales et non-structurales sous l'action de peptidases cellulaires et de protéases virales. Lorsqu'elle est connue ou supposée, la fonction de chaque protéine virale est précisée. La numérotation du premier nucléotide de chaque gène et du premier acide aminé de chaque protéine virale se base sur celle du génome de l'isolat HCV-1. La protéine F est codée à partir d'un cadre de lecture alternatif situé dans le gène de la capsid.

I.3.1 Régions non codantes

I.3.1.1 La région 5' non codante (5'UTR).

La région 5' non codante (5'NC) d'une longueur de 341 nt comprend 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction et 4 domaines riches en structures de type tiges-boucles (domaine I à IV). Les domaines I et II (nt 1 à 115) sont impliqués dans la réplication du génome viral (P Friebe et al. 2001). Les domaines II, III et IV (nt 116 à 341) constituent le site interne d'entrée du ribosome (IRES pour *Internal Ribosome Entry Site*) pour la fixation de la sous-unité 40S du ribosome nécessaire à l'initiation de la traduction. Le codon AUG initiateur de la traduction est situé au sommet de la boucle du domaine IV (Honda et al. 1999; R. C. Rijnbrand & S M Lemon 2000). L'IRES peut représenter une cible pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une étude a ainsi été développée reposant sur l'utilisation de petits ARN interférants inhibant la traduction (Kanda et al. 2007). Un micro-ARN (miR-122), exprimé de manière abondante dans le foie, serait capable de se lier à la région 5' UTR et permet d'induire une augmentation un niveau optimal de réplication virale (Jopling et al. 2005).

I.3.1.2 La région 3' non codante (3'UTR).

La région 3' non codante (3'NC) de taille variable (entre 210 et 250 nt) est située en aval du long cadre de lecture ouvert. Elle comporte 3 régions successives de 5' en 3' : (i) une séquence faiblement conservée non traduite d'environ 30 nts comprenant deux boucles (VSL1 et VSL2), (ii) une région poly U/UC de longueur variable (Kolykhalov et al. 2000), (iii) une séquence fortement conservée de 98 nts, appelée région X, organisée en trois domaines de type tiges-boucle (SL1, 2 et 3) (T Tanaka et al. 1995). Cette région X joue un rôle indispensable dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication (Kolykhalov et al. 2000). La région 3'NC peut interagir avec d'autres protéines cellulaires ce qui permet de stabiliser l'ARN viral en le protégeant d'une éventuelle dégradation (Spångberg et al. 2001), et moduler également l'activité de l'IRES du VHC par le biais d'interaction avec de nombreux facteurs cellulaires, dont la *Polypyrimidine Tract Binding protein* (PTB), protéine impliquée également dans l'initiation de la traduction sous le contrôle de l'IRES (T. Ito & M. M. Lai 1999; Y. Song et al. 2006).

I.3.2 La région codante.

I.3.2.1 Protéines structurales

I.3.2.1.1 La protéine de capsid C ou protéine core.

La protéine core mature contient deux domaines. Le domaine D1, impliqué dans la liaison avec l'extrémité 5'UTR de l'ARN jouerait un rôle dans l'homo-oligomérisation des protéines core matures permettant la formation de la nucléocapside (Kunkel et al. 2001; Ai et al. 2009). Le domaine D2, responsable de sa localisation au niveau des membranes du RE et des gouttelettes lipidiques (Barba et al. 1997; D Moradpour et al. 1996; Rouillé et al. 2006) interviendrait dans le repliement et la stabilité du domaine D1 (Boulant et al. 2006). La protéine core semble indispensable pour recruter les protéines non-structurales, l'ARN et le complexe de réplication au niveau des gouttelettes lipidiques, pour constituer la plateforme d'assemblage viral. L'interaction Core/NS5A apparaît indispensable à la production de virions infectieux (Miyanari et al., 2007). Le rôle précis de l'association entre la protéine core et les gouttelettes lipidiques reste encore mal compris. Néanmoins, le développement de stéatose, comme observé chez certains individus chroniquement infectés, semble résulter d'un effet direct de la protéine de capsid sur le métabolisme lipidique (pour revue (P Roingeard & Hourieux 2008). La protéine de capsid constitue la sous-unité de base pour former, après multimérisation, la nucléocapside virale (Kunkel et al. 2001) Elle fixerait l'ARN viral à son extrémité 5', pour en permettre l'encapsidation (Fan et al. 1999). *In vitro*, de nombreuses fonctions et propriétés ont été attribuées à la protéine core. Elle perturberait le métabolisme lipidique en interagissant avec les gouttelettes lipidiques (Barba et al. 1997; John McLauchlan et al. 2002). Cette interaction, *via* son extrémité carboxy-terminale, pourrait être mise en relation avec le processus de stéatose (Sabile et al. 1999).

I.3.2.1.2 La protéine F ou ARFP

En plus du cadre de lecture ouvert codant pour la polyprotéine, le génome du VHC contient un cadre de lecture décalé par rapport au cadre ouvert principal, au niveau de la séquence codant la protéine de capsid. Ce gène code pour une protéine d'environ 150 aa (Xu et al., 2001), dénommée protéine F (Frameshift) (Xu et al., 2001) ou ARFP (Alternating Reading Frame Protein) (Walewski et al., 2001) de 126 à 160 aa selon le génotype. Ces études *in vitro* indiquent qu'un décalage ribosomique mène au processus de traduction de l'ARF.

Le développement d'une réponse immunitaire contre la protéine ARF chez les patients chroniquement infectés par le VHC indique que cette protéine est exprimée et stimule les réponses immunitaires spécifiques (Z. Xu et al. 2001; Bain et al. 2004). Le rôle biologique de ARF n'est pas encore précisé. La protéine ne semble pas nécessaire pour assurer la réplication de l'ARN du VHC. L'expression de la forme majeure de l'ARFP est réprimée par la protéine core suggérant une corrélation inverse entre l'expression de cette protéine et la réplication du virus (Wolf et al., 2008).

I.3.2.1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe.

La glycoprotéine E1 (gp31-35) est constituée de 192 résidus (aa 192-383) et la glycoprotéine E2 (gp70) de 363 résidus (aa 384-746). Les glycoprotéines E1 et E2 sont produites par clivage protéolytique de la polyprotéine précurseur du VHC par une peptidase signal d'origine cellulaire. La biogenèse, la maturation, l'assemblage et les fonctions de ces deux glycoprotéines seront détaillées dans le paragraphe III.2.

I.3.2.1.4 La protéine p7.

Ce polypeptide de 63 aa, hydrophobe, est situé à la jonction entre les protéines structurales et non structurales (C. Lin et al. 1994; Mizushima et al. 1994). Cette protéine membranaire est composée de deux domaines transmembranaires N et C-terminaux orientés vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al. 2002). Elle s'oligomérisse (Clarke et al., 2006) pour former un pore, « viroporine », qui joue un rôle de canal ionique dans des bicouches lipidiques artificielles (Pavlović et al. 2003; S. D. C. Griffin et al. 2003).

Dans des cellules d'hépatome, les canaux actifs p7 dissipent le gradient de protons des compartiments vésiculaires acides, provoquant une fuite de protons dans le cytosol. Cette inhibition de l'acidification est nécessaire pour la production de particules virales (Wozniak et al. 2010), tandis que les réplicons subgénomiques du VHC ne contiennent pas de p7. Ceci démontre qu'il n'est pas nécessaire à la réplication d'ARN (Sakai et al. 2003; V Lohmann et al. 1999). Elle est essentiel pour l'infection *in vitro* (Jones *et al.*, 2007); (Steinmann *et al.*, 2007) et *in vivo*, chez le chimpanzé (Sakai et al. 2003).

I.3.2.2 Les protéines non structurales et le complexe de réplication

I.3.2.2.1 La protéine NS2.

NS2 est une protéine transmembranaire non essentielle à la formation du complexe de réplication (V Lohmann et al. 1999). La structure cristalline de l'extrémité C-terminale de la

protéine NS2 à partir de la souche H77 indique que NS2 forme un homodimère. La fonction de NS2 sous sa forme mature est inconnue, mais au sein de la polyprotéine, le polypeptide NS2 participe à une activité de protéase responsable de la coupure au niveau de la jonction NS2/NS3 (A Grakoui et al. 1993). Ce clivage joue un rôle important dans la maturation de la polyprotéine, l'infection *in vivo* (Kolykhalov et al. 2000) et la réplication *in vitro* (Welbourn et al. 2005). NS2 est au cœur du clivage entre le polypeptide comprenant les protéines non structurales NS3-NS5B d'un côté et les protéines E2-p7-NS2 de l'autre. Le clivage de l'extrémité N-terminale entre NS2 et p7 se fait par une peptidase signal dans le RE (Carrère-Kremer et al. 2004; Carrère-Kremer et al. 2002). Lorsqu'elle est exprimée seul, NS2 est associée aux membranes du RE (Franck et al. 2005). Des sites naturels de recombinaison du VHC inter-génotypiques ont été cartographiés dans NS2 (Kalinina et al. 2002; I. Moreau et al. 2006; Kurbanov et al. 2008; Demetriou et al. 2011; Virginie Morel et al. 2010) ou à la jonction NS2/NS3 (Noppornpanth et al. 2006; Legrand-Abravanel et al. 2007; Y.-M. Lee et al. 2010; Yokoyama et al. 2011; D. Bhattacharya et al. 2011).

Outre son rôle enzymatique, le domaine C-terminal de la protéine NS2 interviendrait dans l'assemblage viral (C. T. Jones et al. 2007; Jirasko et al. 2008) et lors de la production des virus infectieux (MinKyung Yi et al. 2007; MinKyung Yi et al. 2009). Une interaction avec la protéine p7 pourrait moduler les interactions des glycoprotéines E1 et E2 avec les protéines NS3 et NS5A dans les complexes de réplication associés aux GL. (Phan et al. 2009; Stapleford & Brett D Lindenbach 2011; Ma et al. 2011; C.-I. Popescu et al. 2011).

I.3.2.2.2 La protéine NS3/4A.

NS3 (631aa, nt 3420-5312) est une protéine multifonctionnelle constituée d'un domaine fonctionnel N-terminal de type sérine protéase et d'un domaine C-terminal ARN hélicase/NTPase. L'activité de la protéase de NS3 est dépendante de la protéine transmembranaire NS4A (54aa) qui agit en tant que cofacteur. Cette dernière stabilise également la protéase contre la dégradation protéolytique (François Penin, Brass, et al. 2004; Ralf Bartenschlager et al. 2004). La protéase NS3-4A est responsable du clivage de la polyprotéine dans la région en aval de NS3, (NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B) (R Bartenschlager et al. 1995). Cette activité essentielle à la production des composants du complexe de réplication (Raffaele De Francesco & Giovanni Migliaccio 2005) (Figure 2). Cette activité sérine protéase est cible de la recherche de nouvelles thérapies antivirales (Raney et al. 2010). Le complexe NS3/4A interfère avec les voies de signalisation induites par l'ARN double-brin et semble impliqué dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire

innée en agissant comme un antagoniste des voies TLR-3 et RIG-1, impliquées dans la réponse interféron de type I (Foy et al. 2003; Kui Li et al. 2005; Meylan et al. 2005).

L'activité hélicase à ARN ATP-dépendante du domaine C-terminal de NS3 dépendrait aussi de l'association avec le cofacteur NS4A (Pang et al. 2002). Impliquée lors de l'initiation de la réplication, elle permettrait le déroulement des duplexes ARN/ARN (Tai et al. 1996), et le déplacement des protéines liées à l'ARN (Brett D Lindenbach et al. 2005). Les mécanismes de son action restent peu décrits. L'extrémité N-terminale du domaine hélicase, jouerait un rôle lors des étapes précoces de l'assemblage viral (Phan et al. 2009; Han et al. 2009).

La protéine NS4A est impliquée également dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (J. O. Koch & R Bartenschlager 1999; Neddermann et al. 1999).

I.3.2.2.3 La protéine NS4B.

La protéine NS4B (261 aa, nt 5475-6257) est une protéine hautement hydrophobe ancrée dans la membrane du RE (Hügler et al. 2001; Lundin et al. 2003; Gretton et al. 2005). Cette protéine jouera un rôle important dans la formation d'un complexe de réplication fonctionnel due à la palmitoylation de deux cystéines à l'extrémité C-terminale (G.-Y. Yu et al. 2006), à son implication dans l'hyperphosphorylation de NS5A (J. O. Koch & R Bartenschlager 1999; Neddermann et al. 1999) et finalement à l'interaction entre son extrémité N-terminale et son extrémité C-terminale (Paul et al. 2011).

En outre, NS4B induit également des modifications membranaires intracellulaires, formant un réseau de vésicules membranaires nommé « membranous web » associé aux complexes de réplication de l'ARN du VHC (Egger et al. 2002; L. Gao et al. 2004).

Enfin, NS4B posséderait un domaine de liaison à l'ARN à son extrémité C-terminale (Einav et al. 2008) et pourrait interagir avec d'autres protéines virales afin de moduler l'assemblage viral (D. M. Jones et al. 2009).

I.3.2.2.4 La protéine NS5A.

La phosphoprotéine NS5A (aa1973-2420), ancrée à la membrane du RE, jouera un rôle dans les interactions nécessaires à la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (Brass et al. 2002; François Penin, Brass, et al. 2004). En plus de sa séquence d'ancrage membranaire, NS5A comprend trois domaines distincts I, II et III (Tellinghuisen et al. 2004). Le domaine I contient un motif unique de 4 résidus cystéine conservés intégralement, qui sont absolument essentiels à la réplication d'ARN (Tellinghuisen et al. 2005). En accord avec cette observation, NS5A se lierait à l'ARN du

VHC (L. Huang et al. 2005). Domaine II a été impliqué dans l'inhibition de l'interféron induite par l'ARN double brin. Ce domaine contient la région ISDR (pour *Interferon Sensitivity Determining Region*, aa236-275), inhibant l'action de la protéine kinase (PKR) (M Gale Jr et al. 1998). Le domaine III, région moins conservée, tolérant des insertions ou délétions partielles (Darius Moradpour et al. 2004; Appel et al. 2005), serait impliqué dans l'assemblage des particules virales par interaction avec la protéine Core (Miyanari et al. 2007; Appel et al. 2008). De plus, NS5A interagirait avec l'apolipoprotéine ApoE, requise pour l'assemblage et l'export (Benga et al. 2010).

I.3.2.2.5 La protéine NS5B.

NS5B est une ARN polymérase dépendante de l'ARN, qui joue le rôle de catalyseur au sein de la machinerie de réplication du VHC. NS5B peut initier la synthèse d'ARN *de novo*, au moins *in vitro*, et il est supposé que l'initiation *de novo* est également fonctionnelle *in vivo*. L'activité ARN polymérase ARN-dépendante semble être modulée par l'interaction avec certaines protéines virales autres (NS3 et NS5A) (Ralf Bartenschlager et al. 2004).

I.4. Cycle viral

L'entrée du VHC dans la cellule (Paragraphe III), est un processus séquentiel constitué de plusieurs étapes : l'attachement, ou l'adsorption du virus à la surface de la cellule cible, l'interaction avec le(s) récepteur(s) spécifique(s) et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire aboutissant à l'internalisation du virus dans la cellule. Cette internalisation du VHC par endocytose des récepteurs de surface liés aux particules virales se fait par une voie clathrine-dépendante. Dans les endosomes le faible pH déclenche la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes endosomal. L'ARN génomique est alors libéré dans le cytoplasme.

Une fois l'ARN viral libéré dans le cytoplasme, la traduction débute immédiatement. L'ARN de polarité positive est directement pris en charge par les ribosomes cellulaires au niveau de l'IRES à l'extrémité 5'UTR. L'interaction avec l'IRES entraîne le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction. La machinerie de traduction se met alors en place à la membrane du RE rugueux. La synthèse donne naissance à un polypeptide précurseur de 3000 aa, ancré à la membrane du RE. Ce dernier est cible des protéases cellulaires et virales. Des

clivages co- et post-traductionnels permettent la production de formes matures des protéines du VHC.

Le mécanisme de la réplication n'est que partiellement établi : la transcription des brins d'ARN de polarité positive débute par la synthèse d'un brin complémentaire de polarité négative qui, à son tour, sert de matrice pour la production de brins d'ARN de polarité positive.

La réplication du VHC prend place au sein d'un complexe de réplication dans lequel sont associées les protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, l'ARN viral et des facteurs cellulaires (V Lohmann et al. 1999).

Cette étape du cycle viral entraîne un remaniement caractéristique des membranes cellulaires formant une plate forme pour la réplication virale : le « membranous web »(Gosert et al. 2003). Dans cet environnement, les interactions entre les différents partenaires intervenant dans l'initiation de la réplication seraient favorisées. D'autres interactions des protéines virales avec des facteurs cellulaires, et notamment avec le cytosquelette ont été décrites. Ainsi les protéines NS3 et NS5A interagissent avec les filaments d'actine et les microtubules pour favoriser la mobilité des complexes de réplication (Lai *et al.*, 2008).

Après l'accumulation d'ARN génomique néosynthétisé et des protéines virales, la particule VHC est assemblée dans un compartiment associé au RE en liaison étroite avec la voie de biogenèse des VLDL. Ce processus semble se produire à proximité des gouttelettes lipidiques (GL)(Miyanari et al. 2007). Au cours de l'infection, la protéine NS2 associée aux glycoprotéines d'enveloppe et aux composants des complexes de réplication, s'accumulent dans les sites d'assemblage présents sur les membranes du RE associées aux GL (C.-I. Popescu et al. 2011). L'interaction de p7 -NS2 permettrait le recrutement des protéines de capsides stockées au niveau des GL.(Boson et al. 2011).

Ensuite, les particules de VHC s'associent à des lipoprotéines comme les apolipoprotéines B, C et E (Andre et al. 2002; Nielsen et al. 2006; K.-S. Chang et al. 2007; J.-C. Meunier, Rodney S. Russell, Ronald E. Engle, et al. 2008) et utilisent la voie de sécrétion des VLDL pour son exportation dans la lumière du RE (Gastaminza et al. 2008; D. M. Owen et al. 2009).

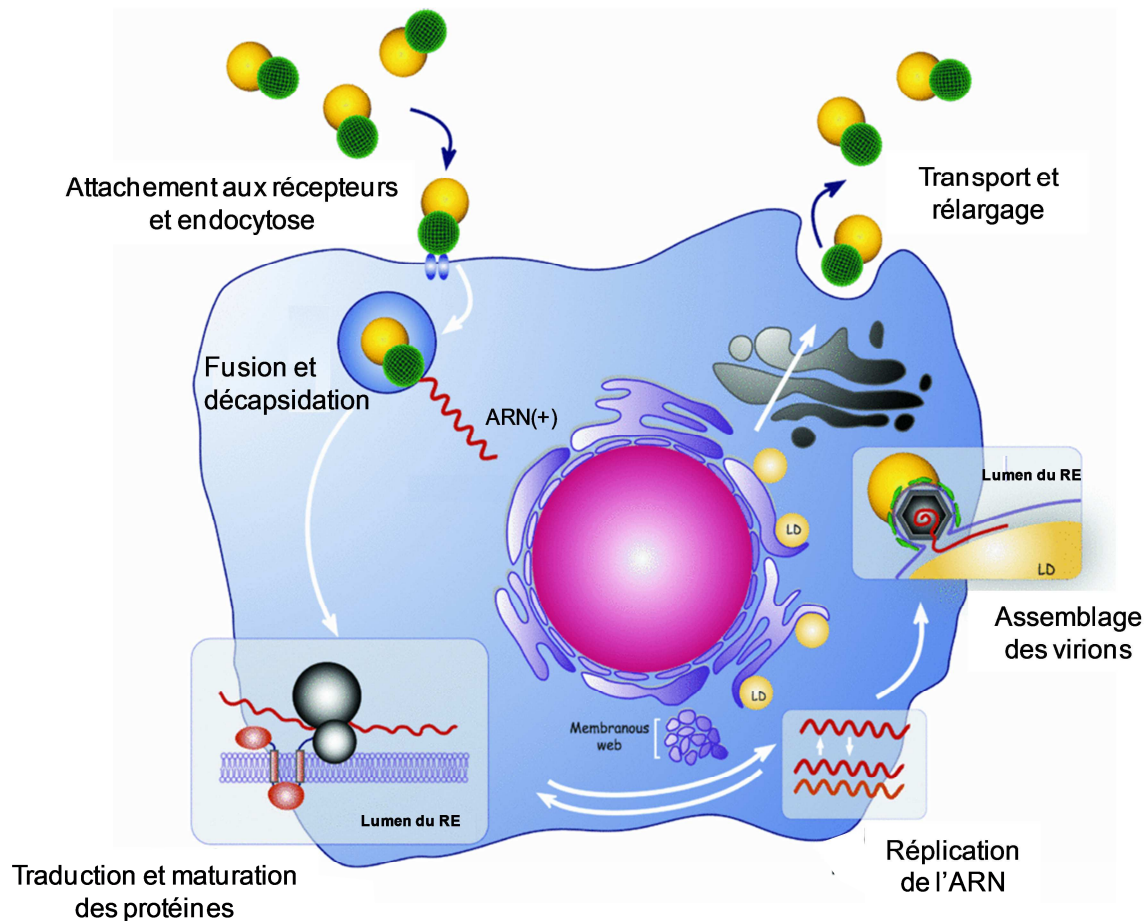


Figure 3 : Schématisation du cycle viral dans un hépatocyte non polarisé

LD : lipid droplets- gouttelettes lipidiques ; membranous web : remaniement membranaire D'après (C. Popescu & Jean Dubuisson 2009)

I.5. Diversité du VHC

I.5.1 Origine de la variabilité génétique

Comme d'autres virus à ARN, le VHC présente une grande diversité génétique. Elle est la conséquence d'une réplication intense aboutissant à la production d'environ 10^{12} virions par jour (Neumann et al. 1998) et du défaut d'activité correctrice de l'ARN-polymérase-ARN dépendante (Steinhauer et al. 1992). Le taux moyen de mutations nucléotidiques varie entre $1,4$ et $1,9 \cdot 10^{-3}$ substitutions nucléotidiques par site, par génome et par an. Cette estimation a été réalisée en comparant les séquences majoritaires de génome complet obtenues après 8 ans d'évolution chez un chimpanzé et 13 ans chez un humain (H Okamoto et al. 1992; Ogata et al.

1991). Récemment, Ribeiro *et al.* ont estimé que le taux de mutation *in vivo* du VHC fluctuait entre 1,6-6,2 10^{-5} mutation par nucléotide et par génome répliqué (Ribeiro et al. 2012).

Parmi les mutations s'accumulant au cours de la réplication, certaines sont létales et conduisent à la production de particules virales défectives. D'autres, dites silencieuses ou synonymes, ne retentissent pas sur la séquence en aa de la protéine virale. Mais elles peuvent avoir un impact sur la structure secondaire de l'ARN génomique. Enfin, certaines mutations ponctuelles participent à la modification de la structure des protéines et à l'émergence de nouveaux variants. La production et la sélection permanente de nouveaux variants viraux sont à l'origine de l'émergence des génotypes du VHC et de leur diversification au cours de l'évolution (P Simmonds 2001).

La nature et l'emplacement des mutations jouent un rôle majeur dans la viabilité de la particule. Les zones du génome correspondant à des fonctions essentielles pour le virus (éléments essentiels à la traduction et à la réplication) ou présentant des contraintes structurales importantes (extrémités 5'NC et 3'NC) sont les plus conservées (Domingo & J. J. Holland 1997). La séquence codant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 est la plus variable du génome. Les régions hypervariables (HVR1 et HVR2) présentent plus de 50% de variation nucléotidique entre les différents isolats (D. B. Smith 1999).

I.5.2 Génotypes

Suivant le degré de divergence génétique entre les souches du VHC, une classification du VHC a été proposée. L'analyse des souches isolées dans différentes régions du monde a permis de définir six génotypes majeurs (isolat partageant plus de 70% d'identité de séquence), numérotés de 1 à 6, et de nombreux sous-types (isolat d'un même génotype présentant plus de 85% d'homologie) (Peter Simmonds et al. 2005). Le système de classification défini en 1994 par Simmonds *et al.* basé sur la comparaison des régions 5'NC des différents isolats, avait été initialement adoptée. (P Simmonds et al. 1994). La découverte de variants asiatiques ayant des valeurs de similarités intermédiaires avait conduit à la définition de nouveaux génotypes nommés 7, 8, 9, 10 et 11 (Tokita et al. 1994; Tokita et al. 1995).

La nomenclature a été redéfinie en 1998 (B. Robertson et al. 1998). Elle repose sur l'analyse du lien phylogénétique entre les variants viraux au niveau de la région NS5B. Les variants du VHC sont classés en 6 clades, puis en sous-types correspondant aux sous-ensembles de virus les plus proches phylogénétiquement au sein d'un même clade. Le type est

désigné par un chiffre arabe (de 1 à 6) auquel est attribué une lettre minuscule (a, b...) correspondant au sous-type. Cette nouvelle nomenclature a conduit au reclassement des virus de types 7, 8, 9 et 11 au sein des virus de type 6, et des virus de type 10 au sein du type 3 (P Simmonds et al. 1996) (Figure 5).

Des génotypes spécifiques ont pu être associés à des localisations géographiques particulières. Les génotypes 1, 2 et 3 sont ubiquitaires avec des prévalences variables d'une région à l'autre. Les sous-types 1a et 1b sont majoritairement répandus en Amérique du Nord, au Japon et en Europe (Figure 4). Il en est de même pour les sous-types 2a et 2b. La répartition des génotypes 5 et 6 apparaît restreinte à certaines régions du globe. Le VHC de génotype type 4 infecte principalement les populations d'Egypte, du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord. Le génotype 5 a été localisé en Afrique du Sud. Le génotype 6 circule dans les pays du Sud-Est asiatique (Zein 2000).

En France, une étude réalisée par le Groupe Français d'Etude Moléculaire des Hépatites Virales (GEMHEP) portant sur 1872 malades suivis dans 14 centres entre 1989 et 1997 a montré que le génotype 1b était le plus fréquent (41%) suivi du génotype 3a (22%), du génotype 1a (16%) et des génotypes 2a et 2c (11%). Le génotype 4 ne représentait alors que 4,5% des cas (Martinot-Peignoux et al. 1999). La prévalence du génotype 4 est maintenant en augmentation en France et en Europe. Dans le sud de l'Europe, elle est plus élevée que dans les autres pays européens (Juan I. Esteban et al. 2008).

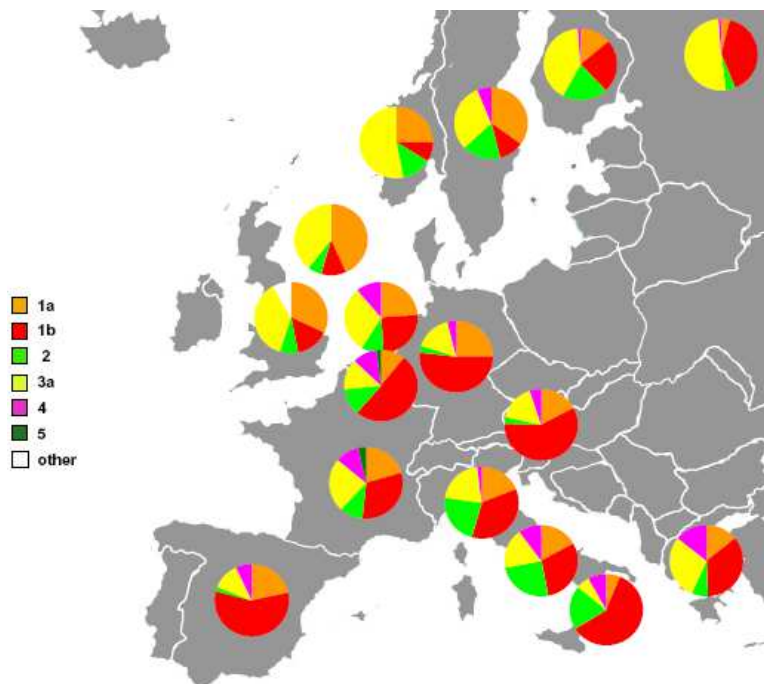


Figure 4 Répartition des génotypes du VHC en Europe

(Juan I. Esteban et al. 2008)

Certains génotypes apparaissent associés à des modes de contamination particuliers. Les génotypes 1b et 2 sont retrouvés plus fréquemment chez des patients transfusés. Des études d'épidémiologie moléculaire ont montré une association entre le sous-type 3a et la contamination par toxicomanie intra-veineuse en Europe. En France les génotypes 1a, 3a et 4a rendent compte de la grande majorité des infections par le VHC chez les toxicomanes. Le génotype 1b est majoritairement retrouvé chez les sujets n'ayant pas de facteur de risque connu.

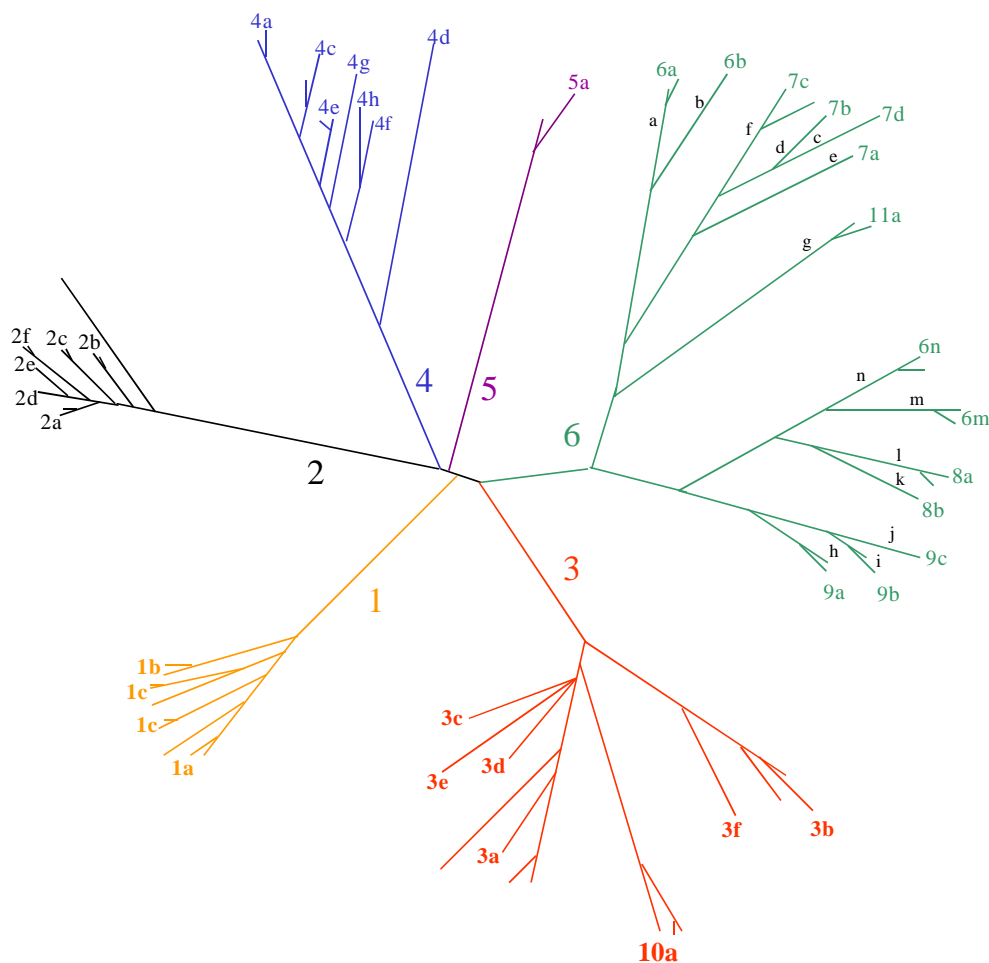


Figure 5 Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC

L'arbre phylogénétique présenté est issu de l'analyse de séquences d'une partie de la région NS5B du VHC. Les amplicons, issus de sérums de patients donneurs de sang chroniquement infectés par le VHC, de provenances géographiques diverses, ont été séquencés et comparés. Les six groupes numérotés (1 à 6) correspondent à l'actuelle classification. Chaque génotype, exception faite du génotype 5, présente de nombreux sous-types, indiqués en lettre minuscules. Certaines souches sont numérotées de 7 à 11 : elles ont été classées lors de leur découverte comme de nouveaux génotypes, mais ont été regroupées par la suite avec les génotypes 3 et 6 (D'après Simmonds *et al.* 1999).

I.5.3 Quasi-espèces

Le concept de quasi-espèce a été appliqué à la virologie pour décrire les caractéristiques de certains virus à ARN (Eigen 1971). Chez un individu infecté par le VHC, le virus circule sous la forme d'une population de variants génétiquement différents mais apparentés, appelés « quasi-espèces ». Par définition, les variants viraux d'une quasi-espèce présentent entre eux au moins 90% d'homologie de séquence (Zein 2000). Il est estimé qu'une population virale, présente dans 1mL de sérum, serait composée de plusieurs centaines de milliers de variants différents (Martell et al. 1992). La quasi-espèce virale comprend donc, un ou plusieurs variants majeurs ainsi qu'une multitude de variants mineurs, représentant une proportion variable par rapport à l'ensemble de la population virale.

Le degré d'hétérogénéité au sein de la quasi-espèce peut être évalué par la complexité génétique. Elle désigne le nombre total de variants viraux identifiés dans un prélèvement. Le nombre de sites variables et le pourcentage des différents variants peut également être estimé (Gómez et al. 1999). La diversité génétique définit la distance génétique moyenne entre les différents variants composant une quasi-espèce.

A un instant donné, la quasi-espèce d'un patient infecté est en équilibre transitoire. Les quasi-espèces se modifient en permanence pour s'adapter à l'environnement sous l'influence de pressions évolutives. Les pressions évolutives de sélection positives exercées sur le génome résultent d'interactions avec les réponses immunitaires de l'hôte. Ces pressions sélectives peuvent induire une modification de la composition des quasi-espèces.

La distribution en « quasi-espèces » du VHC joue un rôle important dans les mécanismes de persistance, la pathogénicité, la résistance aux traitements et la récurrence de l'infection après transplantation.

Deux types de pressions de sélection vont jouer dans le processus d'adaptation.

- Les pressions négatives sont liées aux contraintes conservatrices sur la séquence du génome ou des protéines virales : elles résultent de la nécessité de conserver les propriétés fonctionnelles du génome et des protéines pour assurer la survie des variants.
- Les pressions de sélections positives résultent d'interactions complexes avec les réponses immunes et certaines protéines de l'hôte. Elles évoluent au cours du temps spontanément ou sous l'influence d'événements extérieurs tels qu'une infection intercurrente ou l'administration d'antiviraux.

I.5.4 Les virus recombinants

La recombinaison joue un rôle important dans l'évolution des virus à ARN. Elle est également source de variation génétique. La coinfection d'une même cellule par deux virus est une condition préalable au processus de recombinaison. Il a été montré récemment que deux génomes peuvent se répliquer après coinfection simultanée par deux souches distinctes. Dans le cas de surinfection, la réplication de la seconde souche est généralement inhibée (Schaller et al. 2007).

On distingue deux mécanismes de recombinaison: la ligation simple de deux fragments d'ARN ou le changement de matrice lors de la réplication. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'arrêt et le décrochage de la polymérase lors de l'élongation : un défaut de continuité de la matrice, la présence de séquences spécifiques ou de motifs structuraux, une erreur d'incorporation d'un nucléotide ou une interaction du génome avec une protéine qui ne participe pas à la réplication (Magdalena Figlerowicz et al. 2003)

Ce sont des discordances de typage mises en évidence lors d'analyses phylogénétiques réalisées au niveau de différents fragments génomiques qui ont permis de suspecter la présence de recombinants. Le point de recombinaison peut être identifié plus précisément grâce à différentes méthodes bioinformatiques : (Posada et al. 2002) :

Les méthodes de similarité indiquent la présence de recombinaisons quand les mutations synonymes au niveau des régions variables sont plus nombreuses qu'au niveau des régions conservées. Les méthodes basées sur les distances génétiques détectent les inversions de distances par approche de fenêtre coulissante. Les méthodes phylogénétiques, les plus utilisées, détectent des topologies discordantes au sein des différentes régions du génome. Les méthodes de compatibilité recherchent les discordances phylogénétiques site par site. Les méthodes basées sur la distribution des substitutions, proches des tests de maximum de vraisemblance, recherchent des profils de substitutions spécifiques au niveau des séquences.

Les recombinaisons sont des événements rares *in vivo* et/ou menant souvent à des recombinants défectifs (S Viazov et al. 2000). Le nombre de cas bien documentés est encore faible [pour revu (V. Morel et al. 2011; González-Candelas et al. 2011)]. La plupart des recombinaisons sont de nature inter-génotypique. La première chimère infectieuse identifiée était issue d'un événement de recombinaison homologue inter-génotypique (génotype 1b / génotype 2k) dans le gène NS2 (Kalinina et al. 2002). Quelques recombinaisons intra-génotypiques et même intra-sous-génotypiques ont été décrites (Tableau 1). Une localisation

préférentielle des points de recombinaison au niveau NS2- NS3 semble exister *in vivo* et *in vitro* (Brett D Lindenbach et al. 2005; Pietschmann et al. 2006).

Tableau 1: Schéma des recombinaisons du VHC

Recombinaisons	Gènes	Pays de découverte	Référence
Inter-génotypiques	1b/2k	NS2	Russie (Kalinina et al. 2002)
	2i/6p	NS2/NS3	Vietnam (Noppornpanth et al. 2006)
	2/5	NS2/NS3	France (Legrand-Abravanel et al. 2007)
	2b/1b	NS3	Taiwan (Y.-M. Lee et al. 2010)
	3a/1b	C/E2 et NS5B	Chine (Du et al. 2012)
Intra-génotypiques	1a/1b	NS5B	Perou (Colina et al. 2004)
	1a/1c	E1E2	Japon (Cristina & Colina 2006)
Intra-sous-type	6a/6	NS5B	Japon (H Okamoto et al. 1992)(W. Shi et al. 2012)
	6e/6	NS5B	Japon (W. Shi et al. 2012)
	6e/6h	NS5B	Japon (W. Shi et al. 2012)
	6n/6o	NS5B	Japon (W. Shi et al. 2012)
Intra-patient	1b	E1E2 et/ou NS5A	Espagne (M. P. Moreno et al. 2006)
	1b,2,3a	E1E2 et/ou NS5A	Espagne (Sentandreu et al. 2008)

A partir du nouveau système de culture cellulaire avec la souche JFH1, plusieurs équipes ont construit des VHC chimères avec un point de recombinaison localisé dans le gène NS2 (Kalinina et al. 2002; I. Moreau et al. 2006; Kurbanov et al. 2008; Demetriou et al. 2011; Virginie Morel et al. 2010) ou à la jonction NS2/NS3 (Noppornpanth et al. 2006; Legrand-Abravanel et al. 2007; Y.-M. Lee et al. 2010; Yokoyama et al. 2011; D. Bhattacharya et al. 2011). Des virus chimères construit avec un point de cassure à la jonction p7-NS2 ne produisaient pas de particules infectieuses dans le surnageant de culture de cellules infectées, malgré la mise en évidence d'une répllication du génome (MinKyung Yi et al. 2007).

II. Epidémiologie de l'infection par le VHC

II.1. Données de prévalence et d'incidence

L'OMS estime que dans le monde 150 million de personnes sont chroniquement infectées. Chaque année, 3 à 4 millions de personnes seraient contaminées. Plus de 350 000 personnes décèdent suite à des complications hépatiques liées au VHC. Les pays avec les taux d'infection chronique les plus élevées sont l'Égypte (22%), le Pakistan (4.8%) et la Chine (3.2%) (*Fact sheet* N°164, HCV, OMS juillet 2012).

En Europe, la séroprévalence est variable, fluctuant de 0.4% en Suède, en Allemagne et aux Pays-Bas à environ 2 à 3% dans les pays du pourtour Méditerranéen (Juan I. Esteban et al. 2008; Hatzakis et al. 2011). Une meta-analyse réalisée à partir des données de 22 pays européens estiment le nombre de porteurs chronique à environ 8 millions (Mühlberger et al. 2009).

En France, selon les dernières estimations, la prévalence des anticorps anti-VHC a été estimée à 0,84% (IC95% : 0.65-1.10), ce qui correspond à environ 370 000 personnes porteuses d'anticorps anti-VHC. Chez ces personnes, la prévalence de l'infection chronique est estimée à 65% (280 000 personnes). Les facteurs retrouvés significativement associés à la présence d'anticorps anti VHC sont : l'usage de drogues par voie intraveineuse et/ou nasal, une transfusion de sang réalisée avant 1992, le tatouage, un âge supérieur à 29 ans et la précarité [Prévalence de hépatites B et C en France en 2004, Institut National de Veille Sanitaire (INVS) 2006]. Plus du tiers des personnes infectées par le VHC ignore leur statut sérologique. En 2009, un plan de lutte national sur trois ans a été lancé visant à renforcer le dépistage et à améliorer la surveillance et les connaissances épidémiologiques.

II.1.1 Modes de transmission

La transmission du VHC est essentiellement parentérale (Françoise Roudot-Thoraval 2002)(264). La transfusion des produits sanguins et dérivés (culots globulaires, concentrés plaquettaires et leucocytaires, plasma frais congelé, fractions anti-hémophiliques et immunoglobulines) a joué un rôle majeur dans la diffusion de l'infection jusqu'en 1990 (Tibbs 1995). Puis, l'impact des mesures prises pour l'éviction des dons de sang à risque et l'introduction d'étapes d'inactivation virale dans la préparation des produits dérivés du sang

ont largement modifié le contexte épidémiologique. Actuellement, les hépatites post-transfusionnelles sont devenues quasi-inexistantes (van der Poel 1999). En revanche le risque lié à la toxicomanie par voie veineuse n'a pas diminué au cours des dernières années.

La transmission sexuelle a été évoquée devant la constatation d'une séroprévalence majorée chez les conjoints de sujets infectés par le VHC. Ce risque est très faible et les études de séroprévalence ne permettent pas d'affirmer la transmission par l'intermédiaire des sécrétions vaginales ou du sperme. La transmission intra-familiale a été évoquée suite à l'observation d'une séroprévalence élevée du VHC chez des personnes vivant sous le même toit. L'utilisation d'objets usuels (rasoir, coupe-ongles, brosse à dents) par un ou plusieurs membres de la famille pourrait être à l'origine d'une transmission parentérale dont les modalités sont difficilement identifiables (David et al. 1995).

Concernant la transmission mère-enfant, la contamination est probablement périnatale. L'allaitement maternel ne constitue pas un facteur de risque de transmission. Celui-ci est majoré en cas de charge virale élevée, une situation fréquente chez les mères co-infectées par le VIH. Chez les femmes virémiques non co-infectées, le risque de transmission du VHC est de l'ordre de 4 à 7% (Zanetti et al. 1999; Roberts & Yeung 2002). La transmission nosocomiale du VHC s'explique par le non-respect des règles d'hygiène et des précautions universelles à la suite d'un acte médical. L'étude des chaînes de transmission a permis de prouver qu'en dehors de toute transfusion, la transmission du VHC était possible dans les centres d'hémodialyse (Le Pogam et al. 1998). La possibilité de transmettre le VHC à la suite d'exploration invasive telle qu'une endoscopie avec biopsies a également été démontrée (Sánchez-Tapias 1999).

L'épidémiologie du VHC en Europe est en constante évolution, et les paramètres épidémiologiques ont considérablement changé au cours des 20 dernières années. Quatre facteurs principaux contribuent à ces changements: 1) le renforcement de la sécurité transfusionnelle, 2) l'amélioration des conditions de santé, 3) l'expansion continue de la consommation de drogues par voie intraveineuse et 4) l'immigration vers l'Europe à partir de régions endémiques. L'usage de drogues par voie intraveineuse est devenu le principal facteur de risque de transmission du VHC.

II.2. Histoire naturelle de l'infection

Dans la plupart des cas, le début d'infection est asymptomatique (environ 85% des cas). Les symptômes cliniques, en particulier l'ictère, ne sont observés que dans 10-20% des cas, 2 à 12 semaines après la contamination (Orland et al. 2001). Les autres signes cliniques sont peu spécifiques : l'asthénie, le syndrome pseudo-grippal, dyspepsie et des douleurs abdominales (Morin & Pariente 2002; Rocca et al. 2003; J Tilman Gerlach et al. 2003; Santantonio et al. 2003). Le premier marqueur détectable dans le sérum est l'ARN du VHC dans un délai de 7 à 21 jours après la contamination. Son apparition est suivie d'une augmentation des transaminases sériques au-delà du 15^e jour. Mais ce-ci peut fluctuer selon les individus. En cas d'hépatite C aigüe des fluctuations de l'ALAT, allant de deux à 20 fois la normale ont été décrites (Hajarizadeh et al. 2012). Les anticorps anti-VHC sont détectés dans le sérum 4-10 semaines après la contamination (Mario U. Mondelli et al. 2005). Les premiers anticorps détectés sont habituellement ceux dirigés contre la région NS3 ou contre l'antigène de capsid du VHC. Le diagnostic d'une infection récente est retenu lors d'une séroconversion anti VHC documentée en présence d'ARN du VHC (Hajarizadeh et al. 2012). A l'inverse des hépatites virales A ou B, l'utilisation des IgM anti VHC n'est pas informative. Des taux d'IgM ont été retrouvés élevés tant dans les formes chroniques que dans les débuts d'infection (Quiroga et al. 1991). Des tests de mesure de l'avidité des IgG ont été mis au point pour permettre une datation de l'infection par le VHC ; mais ils ne sont pas utilisés en pratique courante (Kanno & Kazuyama 2002; Klimashevskaya et al. 2007; Coppola et al. 2009; Gaudy-Graffin et al. 2010).

En cas de guérison spontanée (30%) (Figure 6), les transaminases se normalisent en 4-5 semaines précédées par une négativation de l'ARN du VHC. Le titre d'anticorps anti-VHC diminue très progressivement mais ces anticorps restent détectables pendant des nombreuses années (Figure 7). La guérison spontanée a été plus fréquemment décrite chez les sujets ayant présenté initialement une infection symptomatique (J Tilman Gerlach et al. 2003; Santantonio et al. 2003; Santantonio et al. 2006; Kamal et al. 2004). Des facteurs génétiques pouvaient influencer l'évolution de l'histoire naturelle du VHC. Le polymorphisme du gène *interleukine-28B* (*IL-28B*) codant pour l'interféron $\lambda 3$ (INF- $\lambda 3$) aurait un impact sur l'évolution de l'infection. La comparaison de ce polymorphisme (rs12979860) entre 388 individus ayant guéri spontanément et 620 porteurs chroniques montre que le génotype C/C est significativement associé à la guérison spontanée (David L. Thomas et al. 2009). D'autres

auteurs ont confirmé par la suite que la fréquence de l'allèle C était significativement plus élevée en cas de clairance spontanée qu'en cas du passage à la chronicité (Ge et al. 2009; Rauch et al. 2010; Montes-Cano et al. 2010; Tillmann et al. 2010).

L'hépatite chronique C est caractérisée par une persistance de l'ARN du VHC dans le sang d'au moins 6 mois (Figure 7). Le niveau de réplication peut fluctuer au cours du temps. Ceci a été observé en particulier chez les sujets co-infectés par le VIH (E. C. Thomson & Main 2008). Environ 70% des patients infectés vont développer une infection chronique. Des manifestations extra-hépatiques sont observées chez certains patients: cryoglobulinémie, arthrite, glomérulonéphrite, troubles cutanés, dysfonctionnement thyroïdien, thrombocytopénie etc. [pour revue (Sène et al. 2004)]. Les facteurs influant sur la rapidité de la progression de la maladie hépatique sont l'âge, la consommation d'alcool, le sexe et la coinfection avec d'autres virus tels que VIH et le VHB (Hernandez & Sherman 2011; Raimondo et al. 2005). Il existe d'autres facteurs avec une influence moindre comme la consommation de tabac, le surpoids associés ou non à des troubles métaboliques et à une surcharge en fer (Ascione et al. 2007). L'évolution vers la cirrhose survient dans 10 à 20% de cas. Le carcinome hépatocellulaire peut succéder à la cirrhose. Il survient 30 à 40 ans après le début de l'infection (But et al. 2008) (Figure 6).

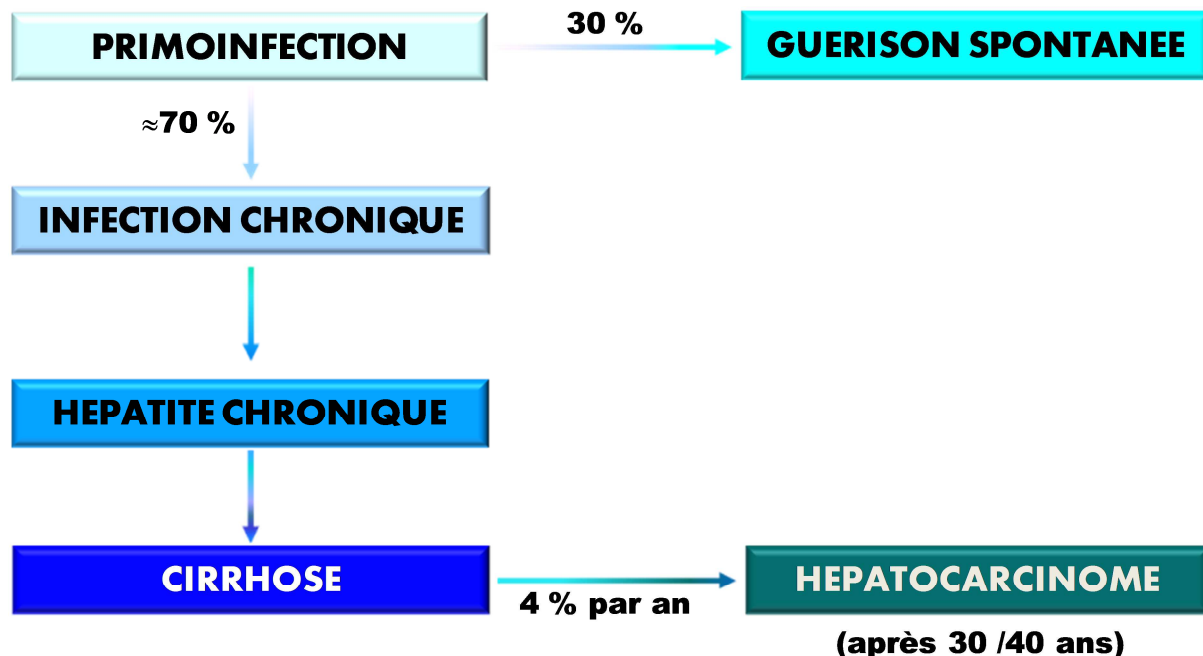


Figure 6: Schématisation de l'histoire naturelle de l'infection par le VHC

Prévalence de hépatites B et C en France en 2004, Institut National de Veille Sanitaire (INVS) 2006]

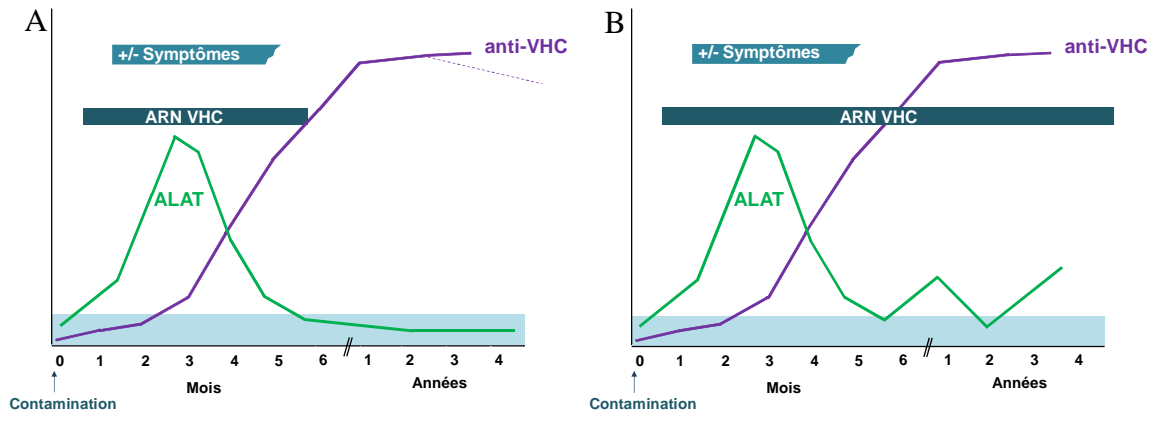


Figure 7: Représentation schématique de l'évolution des marqueurs biochimiques et virologiques lors de la guérison spontanée d'une infection par le VHC (A) ou lors de l'infection chronique (B)

III. Entrée du VHC

L'entrée du VHC dans la cellule est un processus séquentiel constitué de plusieurs étapes (Figure 8):

- l'attachement ou adsorption du virus à la surface de la cellule cible,
- l'interaction avec le(s) récepteur(s) spécifique(s)
- la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire aboutissant à l'internalisation du virus dans la cellule puis à la libération du génome viral dans le cytosol.

L'ensemble de ces étapes mettent en jeu deux principaux types de molécules : les protéines d'enveloppe virales E1 et E2 et les récepteurs cellulaires.

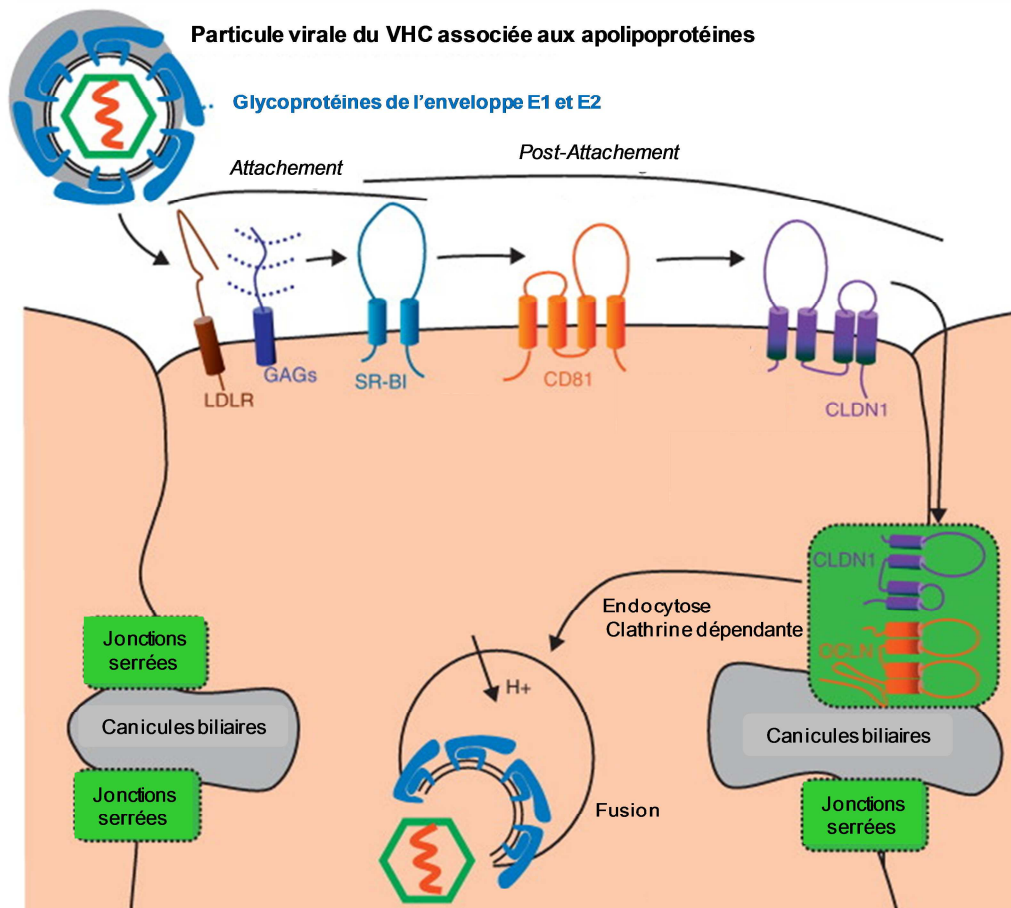


Figure 8: Schéma d'entrée du VHC dans les hépatocytes polarisés

E1 et E2 = Glycoprotéines de l'enveloppe du VHC, LDLR = Récepteur des lipoprotéines de basse densité, GAGs = glycosaminoglycanes, SR-BI = Récepteur scavenger de type B class 1, CLDN1 = claudine 1, et OCLN = occludine. [D'après (Ploss & M. J. Evans 2012)]

III.1. Partenaires cellulaires

III.1.1 Molécules d'attachement

III.1.1.1 Les lectines L-SIGN et DC-SIGN

Les lectines DC-SIGN et L-SIGN (ou DC-SIGNR) forment des homotétramères et possèdent une région C-terminale extracellulaire contenant un domaine capable de reconnaître des structures glycanes de manière dépendante du calcium. La lectine L-SIGN est exprimée, entre autres, à la surface des cellules de l'endothélium bordant les capillaires sinusoides du foie (Pöhlmann et al. 2001). La lectine DC-SIGN est une protéine d'adhésion intervenant dans l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T ou les cellules endothéliales. Ces lectines sont localisées également à la surface de certaines populations de macrophages comme les cellules de Kupffer, présentes dans le parenchyme hépatique (Soilleux et al. 2002). Ces deux lectines sont capables de reconnaître des structures glycaniques à la surface de certains pathogènes (Koppel et al. 2005). Elles permettent l'internalisation d'antigènes présentés aux lymphocytes T (Engering et al. 2002; Bashirova et al. 2001). Toutefois, elles ne peuvent pas être des récepteurs spécifiques pour le VHC car *in vitro* elles ne suffisent pas à l'entrée des VHCpp et des VHCcc (W. K. Lai et al. 2006). Des formes recombinantes de la protéine E2 ainsi que des VHCpp et des particules virales présentes dans le sérum de patients infectés peuvent interagir spécifiquement avec ces deux lectines. Le VHC utiliserait ces protéines pour rentrer dans les cellules, en se liant *via* les résidus sucrés situés en C-terminal de la glycoprotéine d'enveloppe de E2 (E. G. Cormier, Durso, et al. 2004; Lozach et al. 2003; Lozach et al. 2004; Gardner et al. 2003; Pöhlmann et al. 2003). La liaison de E2 à L-SIGN induirait la « transmission » de VHCpp à des cellules hépatiques adjacentes (E. G. Cormier, Durso, et al. 2004; Gardner et al. 2003).

Il est envisageable que ces lectines contribuent à l'établissement de l'infection persistante en capturant et concentrant le virus circulant. Elles permettraient également leur migration jusqu'au foie initiant ainsi l'infection des hépatocytes.

III.1.1.2 Les glycosaminoglycanes (GAG)

De nombreux virus de la famille des *Flaviviridae* utilisent les GAG tels que l'héparane-sulfate, le dermatane-sulfate, le kératane-sulfate ou l'acide hyaluronique, pour s'attacher à la cellule cible (Y Chen et al. 1997; Germi et al. 2002b). Les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate sont présents à la surface des hépatocytes

(Figure 9). Ils sont caractérisés par une grande hétérogénéité structurale leur permettant d'interagir spécifiquement avec de nombreuses protéines. Ils servent de premier point d'attache cellulaire pour certains virus avant l'interaction avec leur (s) récepteur (s) (Villanueva et al. 2005).

Concernant le VHC, la protéine E2 interagirait spécifiquement avec l'héparane sulfate présent à la surface des lignées humaines d'origine hépatique (Barth et al. 2003a). Les résidus chargés positivement de la région HVR1 de E2 interagirait avec les GAG chargées négativement (Koutsoudakis et al. 2006; Barth et al. 2006; Francois Penin et al. 2001). En utilisant le modèle des HCVpp, aucune interaction directe entre E2 et les héparanes-sulfates n'a pas pu être montrée (Callens et al. 2005). L'héparine soluble, des héparinases et le dextrane-sulfate sont capables de diminuer l'attachement aux cellules cibles de particules virales présentes dans le sérum, de HCVpp et de HCVcc, ainsi que d'inhiber l'infection des VHCcc (Arnab Basu et al. 2007; Barth et al. 2006; Barth et al. 2003b; Koutsoudakis et al. 2006; Germi et al. 2002a; Cribier et al. 1998; K Meyer et al. 2000). Des expériences de cinétique à 4°C et à 37°C suggèrent que les GAG faciliteraient l'attachement des VHCcc à la surface des cellules cibles (Mirjam B Zeisel et al. 2007; Koutsoudakis et al. 2006). Toutefois, l'analyse de la séquence de la protéine E2 ne permet pas de définir de séquences consensus impliquées dans cette interaction (Olenina et al. 2005). L'interaction E2-GAG n'est pas clairement définie. Une interaction indirecte entre le VHC et les GAG *via* les lipoprotéines associées aux particules virales [comme la lipoprotéine lipase (LPL)] permettrait cette interaction (Andréo et al. 2007). Néanmoins, l'attachement des particules virales *via* la LPL semble diriger les particules vers une voie non-productive, inhibant l'infection des cellules cibles par les VHCcc.

III.1.1.3 Récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R)

LDL-R joue un rôle dans le métabolisme du cholestérol qui est transporté sous forme de LDL aux cellules hépatiques. Plusieurs travaux ont suggéré la participation du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) dans l'entrée virale lors d'une infection par le VHC (Figure 9) (Agnello & Abel 1997). La densité du VHC dans le sérum des patients infectés est hétérogène et étonnement basse (Andre et al. 2002) suggérant une association aux LDL et VLDL, et l'utilisation du LDL-R comme récepteur des cellules cibles. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des anti-LDL-R, anti-ApoB, anti-ApoE, VLDL et des LDL purifiées inhibent l'entrée du VHC (K.-S. Chang et al. 2007; Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003; Germi et al. 2002a; S Wünschmann et al. 2000; Monazahian et al. 1999; Agnello et

al. 1999). Une association entre l'accumulation de l'ARN du VHC dans les hépatocytes primaires, l'expression de l'ARN messager du LDL-R et l'entrée des LDL a été montrée (Molina et al. 2007). La glycoprotéine E2 interagirait avec les LDL (Nahmias et al. 2006; Wunschmann et al. 2006) et E1 avec les apolipoprotéines (Mazumdar et al. 2011), pour former des complexes facilitant l'entrée du virus *via* le LDL-R dans les cellules hôtes. Néanmoins, le LDL-R est exprimé également à la surface de cellules non permissives au VHC (Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003), suggérant qu'il n'est pas la seule voie d'entrée des particules.

III.1.2 Récepteurs

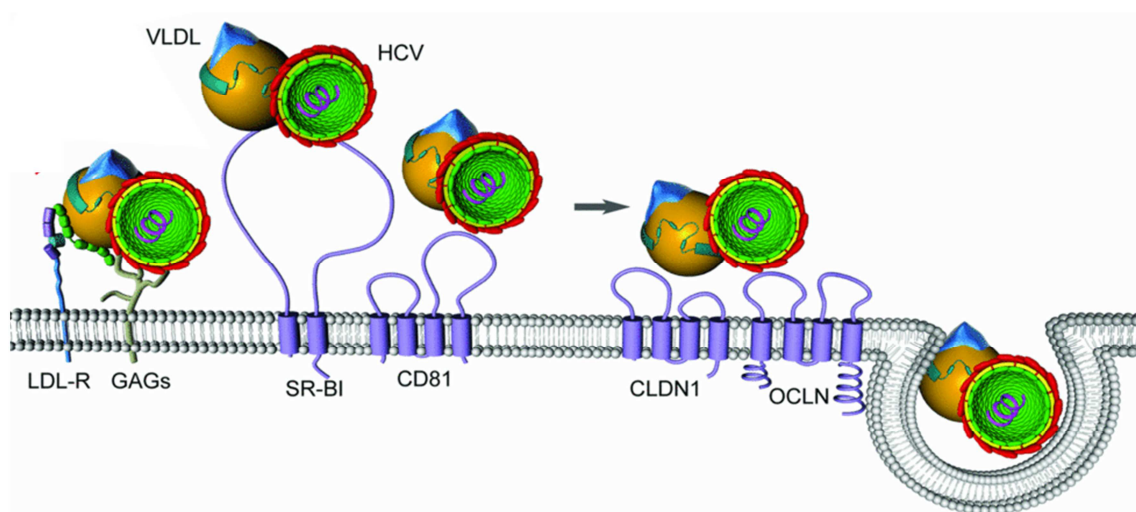


Figure 9: Interaction virus-cellule hôte

(C.-I. Popescu & Jean Dubuisson 2010). Sur ce schéma, les glycosaminoglycanes (GAGs) ainsi que le récepteur au LDL (LDL-R) facilitent l'attachement du VHC. Puis, le virus interagit avec le complexe récepteur formé par SR-BI et CD-81. Le virus est ensuite transféré aux jonctions serrées où il interagit avec les protéines claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN). Le virus est alors endocyté de façon dépendante de la clathrine.

III.1.2.1 La tétraspanine CD81

La molécule CD81 est une protéine appartenant à la famille des tétraspanines. Ces protéines sont composées de quatre DTM, deux boucles extracellulaires (une petite et une grande) et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Figure 9). Cette molécule est un récepteur exprimé à la surface de tous les types cellulaires, à l'exception des hématies et des plaquettes (Levy & Shoham 2005). Elle est impliquée dans la différenciation cellulaire, l'adhésion et la prolifération cellulaire, la motilité et la signalisation.

La glycoprotéine E2 du VHC est capable d'interagir avec CD-81 *via* sa grande boucle extracellulaire (LEL). De plus, l'interaction entre la forme soluble de E2 (sE2) et le CD81

humaine peut être inhibée par du sérum de chimpanzés vaccinés avec sE2 (Pileri et al. 1998). Depuis, le rôle de CD81 dans l'infection du VHC a été confirmé en utilisant les modèles HCVpp et VHCcc. En effet, l'entrée de ces particules virales est inhibée par des anticorps dirigés contre CD81, ainsi que par une forme soluble de la LEL de CD81 (Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003; M. Hsu et al. 2003; E. G. Cormier, Fay Tsamis, et al. 2004; D. Lavillette et al. 2005; J. Zhong et al. 2005). En outre, l'utilisation d'ARNs interférents réduisant l'expression de CD81 dans les cellules Huh-7 diminue remarquablement l'infection par les VHCpp, les VHCcc et les particules dérivées de sérums de patients infectés (Jie Zhang et al. 2004; Mirjam B Zeisel et al. 2007; Molina et al. 2008). Des résidus appartenant notamment aux régions hypervariables de E2 joueront un rôle important dans cette interaction (R. Roccasecca et al. 2003; H. E. Drummer et al. 2006).

La présence de CD81 est nécessaire pour l'entrée des VHCpp de tous les génotypes (Dimitri Lavillette et al. 2005; J A McKeating et al. 2004). Cependant, il semblerait que l'affinité de E2 pour CD81 diffère selon le génotype viral (A. T. Yagnik et al. 2000; R. Roccasecca et al. 2003). Une étude récente suggère que CD81 initie très tôt la fusion pH-dépendante du VHC dans le processus d'entrée (N. R. Sharma et al. 2011).

III.1.2.2 Le récepteur « scavenger » classe B de type (ISR-BI)

La molécule SR-BI est un récepteur membranaire présent sur la plupart des cellules, et particulièrement sur les cellules hépatiques. Cette protéine traverse deux fois la membrane plasmique, avec les extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques et une boucle extracellulaire, présentant neuf sites potentiels de N-glycosylation (Figure 9) (Rhains & Brissette 2004). SRBI est un acteur clé du métabolisme lipidique qui interagit avec différentes lipoprotéines. SR-BI est notamment important dans le transfert des lipides vers la cellule. Il est capable de modifier la composition lipidique de la membrane plasmique. C'est le principal récepteur des lipoprotéines de haute densité (HDL). Il pourrait aussi jouer le rôle de récepteur pour les LDL et VLDL (Acton et al. 1996).

Le récepteur SR-BI a été identifié comme un récepteur potentiel du VHC en utilisant une forme soluble de E2, (Scarselli et al. 2002). Son rôle dans l'entrée virale a été démontré par l'utilisation de VHCpp et VHCcc (Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003; Cécile Voisset et al. 2005; Dimitri Lavillette et al. 2005; S. B. Kapadia et al. 2007). Des anticorps anti-SR-BI inhibent l'interaction de SR-BI avec des formes solubles de E2, des VHCpp et des VHCcc ((Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003; Catanese et al. 2007; S. B. Kapadia et al. 2007; Mirjam B Zeisel et al. 2007). Des anticorps dirigés contre les lipoprotéines spécifiques inhibent

également l'interaction entre SR-BI et le virus. Par contre, ce n'est pas le cas des certains anticorps dirigés contre les glycoprotéines E1 et E2 (Maillard et al. 2006). L'infection en absence de lipoprotéines peut aussi être inhibée par des anticorps anti-SR-BI (Catanese et al. 2007). Egalement, l'infection est fortement inhibée lors de l'utilisation d'ARNs interférents dirigés contre SR-BI. Ces derniers permettent une réduction efficace de l'expression de SR-BI à la surface des cellules hépatocytaires (Dimitri Lavillette et al. 2005; Cécile Voisset et al. 2005; Mirjam B Zeisel et al. 2007). Par ailleurs, la surexpression de SR-BI et SR-BII (une isoforme de SR-BI) peut augmenter le niveau d'infection de cellules cibles par des VHCcc (Grove et al. 2007).

La région HVR1 de E2 est nécessaire à la reconnaissance de SR-BI (Scarselli et al. 2002; Birke Bartosch, Vitelli, et al. 2003). L'augmentation de l'infectivité des VHCpp induite par les HDL est dépendante de l'interaction entre la région HVR1 de E2 et SR-BI (Birke Bartosch et al. 2005; Marlène Dreux et al. 2006; Cécile Voisset et al. 2005). Les résidus L339 et G406 de cette région semblent être impliqués (Birke Bartosch et al. 2005).

La molécule SR-BI pourrait également interagir avec l'apolipoprotéine sérum amyloïde A (SAA) et l'internaliser (Baranova et al. 2005; L. Cai et al. 2005). Des travaux ont montré la capacité des anticorps anti-CD81 et anti-SR-BI à inhiber l'entrée des VHCpp. La coopération de SR-BI et CD81 aurait lieu pendant une étape succédant l'attachement de l'entrée du VHC (S. B. Kapadia et al. 2007; Mirjam B Zeisel et al. 2007).

III.1.2.3 Claudine-1 (CLDN1), 6, 9

Les protéines claudines appartiennent à la famille des protéines des jonctions serrées qui sont chargées de limiter le passage des solutés à travers l'espace intercellulaire (Schneeberger & Lynch 2004). La Claudine-1 est une protéine ubiquitaire exprimée principalement dans le foie qui exprime également d'autres claudines (Rahner et al. 2001). Ces protéines présentent quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires. Leurs extrémités N et C-terminales sont dirigées vers le cytoplasme (Figure 9).

La claudine-1 est nécessaire à l'entrée des HCVpp et des HCVcc (M. J. Evans et al. 2007; Meertens et al. 2008). La réduction de l'expression de CLDN-1 dans les cellules hépatiques par des ARN interférents ou par l'utilisation d'Ac anti-CLDN1 entraîne une diminution ou une inhibition de l'entrée des VHCpp et VHCcc dans des cellules cibles. De manière intéressante, l'expression de CLDN-1 dans certaines lignées non hépatiques, telles que les HEK-293T et SW13, les rend permissives à l'infection par les VHCpp et VHCcc (M. J. Evans et al. 2007; W. Yang et al. 2008). Il en est de même pour les CLDN-6 et -9 en

utilisant des VHCpp de différents génotypes. L'entrée des VHCpp dans les cellules HEK-293T exprimant les CLDN-1, -6 ou -9 peut être inhibée en présence de sérums de patients infectés par le VHC et en présence des anticorps anti-CD81. Cette inhibition est également observée par la diminution de l'acidité des endosomes *via* le traitement des cellules par la bafilomycine A1. L'expression de la CLDN-1 a permis une infection des VHCpp-1a et 1b dans ces cellules. Par contre, l'entrée médiée par la CLDN-6 était faible et détectable uniquement pour le génotype 1a, alors que les cellules exprimant la CLDN-9 ne s'infectent pas (Meertens et al. 2008).

Des travaux récents montrent que la phosphorylation sur les sérines en position 192, 205, 206 et la thréonine 191 pourrait réguler l'assemblage de la claudine-1 au niveau des jonctions serrées (Ahmad et al. 2011).

Dans les tissus hépatiques (normaux ou infectés par le VHC), la CLDN-1 est exprimée, en plus des jonctions serrées, dans les surfaces apicales et basolatérales des hépatocytes. Elle co-localise avec CD81 dans ces deux régions (H. J. Harris et al. 2010a; Reynolds et al. 2008). Des travaux récents montrent que la formation d'un complexe CD81-Claudine-1 joue un rôle essentiel lors du processus d'entrée du VHC (H. J. Harris et al. 2010a). Dans le même sens, une étude très récente a permis d'observer une diffusion libre de tous les récepteurs dans des cellules hépatocytaires, hormis l'occludine qui serait confinée aux jonctions serrées. Les molécules CD81 et Claudine-1 diffuseraient à travers de la membrane sous la forme d'un complexe (H. J. Harris et al. 2010b).

III.1.2.4 L'occludine (OCLN)

L'occludine est une protéine transmembranaire des jonctions serrées très exprimée dans le foie (Saitou et al. 1997). Son implication dans l'entrée du VHC a été découverte récemment par l'expression d'une banque d'ADNc de cellules hépatiques humaines dans un contexte murin (Ploss et al. 2009). En effet, l'expression de l'occludine par un clone de cellules murines NIH3T3 exprimant les autres facteurs d'entrée CD81, SR-BI et claudine-1 augmente très fortement la permissivité cellulaire aux VHCpp. De plus, l'utilisation des ARN interférents ciblant l'occludine inhibent l'infection par les VHCpp et VHCcc de cellules hépatocytaires naturellement permissives (S. Liu et al. 2009; Ploss et al. 2009). Comme CLDN-1, son rôle dans l'entrée du VHC pourrait intervenir tardivement au cours de l'entrée après une migration latérale des complexes virus-récepteurs au niveau des jonctions serrées (S. Liu et al. 2009; Benedicto et al. 2008).

III.1.2.5 Récepteurs à tyrosine kinase (RTK), tels que des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) et EphA2 du récepteur éphrine

Les travaux de Lupberger *et al.* ont confirmé la pertinence de l'EGFR et RTK Eph2A pour l'entrée du VHC par régulation négative de l'infection par des inhibiteurs spécifiques de la protéine kinase de l'EGFR (erlotinib, gefitinib, le lapatinib) et EphA2 (dasatinib des hépatocytes primaires humains. Cependant, l'entrée d'autres virus comme le MLV ou le virus de la rougeole n'a pas été altérée par le même traitement. Les inhibiteurs ne compromettent pas la réplication virale dans un système d'entrée indépendante du modèle réplicon, suggérant une spécificité pour le processus d'entrée. En outre, les auteurs montrent que l'entrée du VHC est nettement améliorée par les deux ligands du EGFR, le EGF et le TGF- α . Ces effets sont réversibles par un traitement à l'erlotinib ou un anticorps EGFR (Lupberger et al. 2011).

III.1.2.6 Le rôle des lipoprotéines

Il est clairement démontré que les lipoprotéines sont capables de moduler l'entrée du VHC. L'infection de cellules cibles avec des sérums de patients infectés est inhibée par les VLDL et LDL purifiées (Agnello et al. 1999). Par ailleurs, André et *al.* ont mis en évidence que des formes circulantes du VHC de faible densité, nommées LVP, résultaient de l'association avec les lipoprotéines de faible (LDL) ou de très faible densité (VLDL) (André et al. 2002). Les LDL oxydées sont capables d'inhiber l'infection des cellules cibles par les HCVpp et les HCVcc (Thomas von Hahn et al. 2006). Au contraire, les HDL facilitent l'entrée des VHCpp. Cet effet facilitateur est dépendant de l'activité de transfert lipidique de SR-BI (Marlène Dreux et al. 2006; Cécile Voisset et al. 2005). Il a été proposé que l'apolipoprotéine C1 serait un des composants responsables de l'interaction des HDL avec les particules virales (J. C. Meunier et al. 2005). L'apolipoprotéine sérum amyloïde A (SAA) est une protéine produite par le foie après une infection, un dommage tissulaire ou une inflammation. Elle inhibe l'entrée des VHCpp et des VHCcc et cette activité antivirale est modulée par les HDL (Z. Cai et al. 2007; Lavie et al. 2006). La SAA peut interagir et être internalisée par SR-BI (Baranova et al. 2005; L. Cai et al. 2005). Cependant il a été montré que l'inhibition de l'entrée des VHCpp par SAA est due à une interaction avec les particules virales et pas à une compétition pour le récepteur SR-BI. Les VLDL pourraient participer à la morphogénèse du virus dans ces cellules.

Une autre protéine présente dans le sang circulant, la lipoprotéine lipase (LPL), permet une interaction indirecte du VHC avec les glycosaminoglycanes. La liaison de ces LVP à des

récepteurs spécifiques des lipoprotéines, favoriserait l'entrée du virus dans la cellule contribuant de ce fait à son infectivité (Andréo et al. 2007). Néanmoins, l'attachement des particules virales *via* la LPL semble diriger les particules vers une voie non-productive puisqu'elle inhibe l'infection par les VHCcc.

III.1.2.7 La protéine EWI-2wint

Des travaux récents suggèrent qu'en plus de la présence de facteurs d'entrée, le tropisme hépatocytaire du VHC pourrait être lié à l'absence d'inhibiteurs de cette étape. Ainsi, l'expression d'un partenaire de CD81 appelé EWI-2wint36 modulerait l'entrée du VHC dans les cellules, en bloquant l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du virus avec CD81 (Rocha-Perugini et al. 2008). La protéine EWI-2wint est exprimée dans un grand nombre de lignées cellulaires mais absente dans les hépatocytes. EWI-2wint est un produit de clivage de EWI-2, un partenaire majeur de CD81 par lui-même inhibiteur. Il est possible que la protéase responsable du clivage soit absente dans les hépatocytes ou que EWI-2 ne soit pas accessible à cette protéase dans ces cellules.

III.1.2.8 CD229

Une étude récente propose le récepteur SLAM-CD229 hépatique comme un facteur de fixation et d'entrée du VHC dans les hépatocytes. La molécule CD229 est un membre de la famille SLAM (signaling lymphocytic activation molecules), exprimé sur la surface des hépatocytes humains. Les récepteurs de cette famille, initialement décrit sur la surface des leucocytes (superfamille des Ig) sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T et B. Elle est composé de quatre domaines extracellulaires appelés «immunoglobulines-like". Il est le seul membre de la famille SLAM capable de s'auto-intérioriser. La diminution de l'expression du récepteur CD229 par des siRNA (small interfering RNA) ainsi que l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le récepteur, diminuent l'infection des hépatocytes par le virus JFH-1. La surexpression dans les cellules permissives Huh-7 amplifie jusqu'à trois fois l'attachement du VHC et son entrée virale par rapport aux cellules non transfectées (présentation oral O7.06 par Flora Cartier lors du congrès « 18th symposiumon HCV and related virus »).

III.1.2.9 Récepteur d'absorption du cholestérol Niemann-Pick C1like 1 (NPC1L1)

Sainz *et al.* ont récemment découvert un récepteur de surface (Sainz et al. 2012). L'infectivité du VHC se réduit d'une façon similaire en utilisant des Ac spécifiques anti-NPC1L1 que quand des anti-CD81 spécifiques sont utilisés.

III.2. Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2, jouent un rôle essentiel à différentes étapes du cycle réplcatif du VHC. Elles sont essentielles à l'entrée dans la cellule de l'hôte, en se liant aux récepteurs et en induisant la fusion avec la membrane de la cellule hôte. Comme pour d'autres *Flaviviridae*, elles participent à l'assemblage des particules virales.

III.2.1 Biogenèse

Le génome du VHC code deux protéines d'enveloppe : la glycoprotéine E1 (gp31-35) est constituée de 192 résidus (aa 192-383) et la glycoprotéine E2 (gp70) de 363 résidus (aa 384-746). E1 et E2 sont produites par clivage protéolytique de la polyprotéine précurseur du VHC par une peptidase signal d'origine cellulaire (SPP). Les clivages co-translationnels au niveau des sites C/E1, E1/E2 et E2/p7/NS2 produisent E1 et un précurseur de E2, E2/p7/NS2, rapidement clivé pour produire E2, E2/p7 et NS2) (J Dubuisson et al. 1994) (Figure 10).

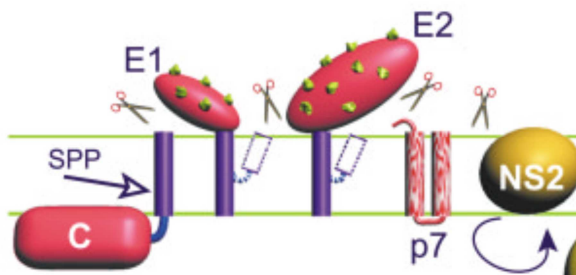


Figure 10: Biogenèse et clivage E1 et E2 du VHC

D'après (François Penin, Jean Dubuisson, et al. 2004)

Comme protéines transmembranaires de type I, elles comportent un large ectodomaine amino-terminal hautement glycosylé (160 et 334 aa, E1 et E2 respectivement) et un unique domaine transmembranaire (DTM) carboxy-terminale (30 aa) d'ancrage dans le réticulum endoplasmique. Lors de la traduction de l'ORF, le domaine 3 de la protéine de la capsid est responsable du signal de clivage entre C et E1 ainsi que de la translocation de l'ectodomaine de E1 dans la lumière du RE (Santolini et al. 1994). De même, les parties C-terminales de E1 et E2 font office de séquences de translocation vers la lumière du RE pour l'ectodomaine de E2 et pour p7 respectivement (Laurence Cocquerel et al. 1999; Laurence Cocquerel et al. 2000). Ultérieurement, les DTM des deux glycoprotéines sont ancrés dans la membrane du RE et les glycoprotéines forment des hétérodimères E1E2 qui sont retenus au niveau de ce compartiment.

III.2.2 Maturation

Au cours de son passage dans le RE et l'appareil du Golgi, les protéines immatures subissent différentes modifications co et post-traductionnelles telles que la formation de ponts disulfure, la N- et la O-glycosylation, le clivage de peptide signal, les interactions avec les protéines chaperons, etc. A l'issue de ces transformations, les protéines seront sous leur forme mature et correctement repliées.

Généralement, les enveloppes de virus enveloppés sont N-glycosylées en utilisant la machinerie de la cellule infectée. Ainsi, les glycoprotéines virales vont être modifiées par des glycanes caractéristiques de la cellule hôte. Tout d'abord, la glycosylation permet un repliement correct des protéines virales. Les glycanes associés peuvent jouer un rôle dans les différentes étapes de l'entrée virale. Ensuite, les glycanes peuvent aider les virus à échapper au système immunitaire de l'hôte, masquant des régions potentiellement immunogènes. Dans le cas du VIH, l'existence d' « un bouclier glycanique » a été clairement décrit (Wyatt et al. 1998; Wei et al. 2003).

La N-glycosylation passe par le transfert d'un glycane par l'enzyme cellulaire oligosaccharyltransférase (OST) à une chaîne polypeptidique en cours de synthèse après la reconnaissance du motif consensus spécifique Asparagine- X_1 -Sérine/Thréonine- X_2 . La nature des aa X_1 et X_2 peut modifier les conditions environnementales et l'activité de l'OST (Susan H. Shakin-Eshleman et al. 1996; Mellquist et al. 1998), Tableau 2. Les séquons potentiels ne sont pas glycosylés avec la même efficacité. Ainsi la présence d'un résidu thréonine en position +2 du séquon est plus favorable que celle d'un résidu sérine (Lakshmi Kasturi et al. 1995).

Tableau 2: Nature des acides aminés (AA) influençant l'efficacité de la N-glycosylation

Asparagine-X ₁ -Sérine/Thréonine-X ₂		
	Contexte favorable en X ₁	Contexte favorable en X ₂
Petit acide aminé	Glycine	Arginine
AA chargés positivement	Lysine, Arginine, Histidine	
AA portant un résidu hydroxylé	Sérine, Thréonine	Sérine, Thréonine
Contexte défavorable en X ₁ / Contexte défavorable en X ₂		
	Proline	Proline
AA hydrophobes de grande taille	Leucine, Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine	Tryptophane
AA chargés négativement	Acide glutamique, Acide aspartique	Acide glutamique

Durant leur synthèse, les ectodomaines des glycoprotéines d'enveloppe du VHC sont fortement glycosylés dans la lumière du RE. La glycoprotéine E1 (gp31-35) présente 6 sites potentiels de N-glycosylation. Quatre d'entre eux sont très conservés quel que soit le génotype [aa 196 (E1N1), aa 209 (E1N2), aa 234 (E1N3) et aa 305 (E2N4)] (Figure 11). D'autres sites potentiels ne sont conservés que pour certains génotypes : le site en position 250 est conservé au sein des génotypes 1b et 6, le site en position 299 l'est aussi au sein de génotype 2b (Goffard & Jean Dubuisson mars; M. Zhang et al. 2004) (Tableau 3).

Tableau 3 Pourcentage de conservation des sites potentiels de N-glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC.

(D'après Helle et al. 2007)

Genotype	n ^a	% Conservation										
		417 (N1)	423 (N2)	430 (N3)	448 (N4)	476 (N5)	532 (N6)	540 (N7)	556 (N8)	576 (N9)	623 (N10)	645 (N11)
1	294	99.7	100	98.3	98.0	39.1	97.6	98.3	99.3	98.6	99.7	99.7
1a	77	100	100	98.7	98.7	97.4	90.9	100	100	100	100	100
1b	213	99.5	100	98.1	97.7	17.8	100	97.7	99.5	98.6	99.5	99.5
2	51	100	100	98.0	100	88.2	100	100	96.1	100	100	98.0
2a	21	100	100	95.2	100	90.5	100	100	95.2	100	100	100
2b	25	100	100	100	100	92.0	100	100	96.0	100	100	96.0
3	68	100	98.5	100	100	98.5	97.1	0	86.8	98.5	98.5	100
3a	66	100	98.5	100	100	100	97.0	0	86.4	98.5	98.5	100
4	9	100	100	100	100	88.9	100	100	100	100	100	100
4a	8	100	100	100	100	87.5	100	100	100	100	100	100
5	2	100	100	100	100	0	100	50	100	100	100	100
6	27	100	100	96.3	100	85.2	100	3.7	100	96.3	100	100
6a	15	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100
Total	451	99.8	99.8	98.4	98.7	57.2	98.0	77.8	97.1	98.7	99.6	99.6

n^a, nombre de séquences

La glycoprotéine E2 (gp70) possède 10 ou 11 sites de glycosylation en fonction des génotypes viraux. Neuf sites sont très conservés quel que soit le génotype [aa 417 (E2N1), 423 (E2N2), 430 (E2N3), 448(E2N4), 532 (E2N6), 576 (E2N9), 623 (E2N10) et 645 (E2N11)] (Tableau 4). Un site en position 476 semble rarement présent au sein des séquences de génotype 1b. Un autre site en position 540 est absent pour le génotype 3 et pour la majorité des génotypes 6. Malgré la grande variabilité du VHC, la conservation importante des sites de glycosylation suggère un rôle essentiel des glycanes dans le cycle viral. Le pourcentage de conservation des sites potentiels de N-glycosylation au sein des glycoprotéines d'enveloppe E1 (Tableau 3) et E2 (Tableau 4) du VHC pour les génotypes 1 à 6 a été estimé (Helle et al. 2010).

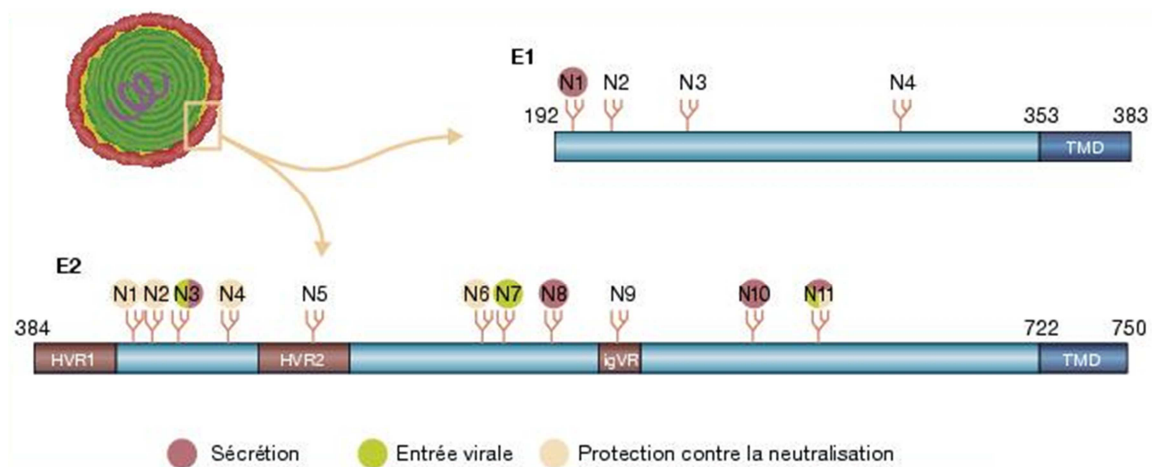


Figure 11 Représentation des sites potentiels de N-glycosylation sur E1 et E2 et ses possibles rôles.

Les sites de glycosylation présents sur les protéines d'enveloppe sont indiqués par N suivi du numéro correspondant à la position relative sur la séquence. TMD : domaine transmembranaire ; HVR : région hypervariable ; IgVR : région variable intergénétypique (Helle et al. 2009).

Tableau 4 Pourcentage de conservation des sites potentiels de N-glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHC.

(D'après Helle et al. 2007)

Genotype	n ^a	% Conservation at site:					
		196 (N1)	209 (N2)	234 (N3)	250	299	305 (N4)
1	1,119	98.2	98.7	97.0	29.4	0	99.1
1a	768	98.7	98.8	96.5	0	0	99.2
1b	345	97.1	98.6	98.0	95.4	0	98.8
2	74	100	100	95.9	0	51.4	98.6
2a	22	100	100	86.4	0	0	100
2b	39	100	100	100	0	97.4	97.4
3	98	100	100	100	0	0	100
3a	75	100	100	100	0	0	100
4	26	100	100	100	0	0	100
4a	12	100	100	100	0	0	100
5	21	100	100	100	0	0	100
6	55	98.2	94.5	100	96.4	0	98.2
6a	19	100	100	100	94.7	0	100
Total	1,393	98.5	98.8	97.3	27.4	2.7	99.1

^a n, number of sequences.

Sur les 5 sites potentiels de N-glycosylation de la glycoprotéine E1, un d'entre eux ne soit pas modifié par l'OST (Fournillier-Jacob et al. 1996). L'analyse de la séquence en aa indique que l'absence de glycosylation sur le site E1N5 due à la présence d'un tryptophane en position X₁ et d'une proline en X₂. De plus, l'efficacité de glycosylation de la glycoprotéine E1 est dépendante de la présence d'une séquence en aval de celle-ci sur la polyprotéine virale (Dubuisson et al. 2000). En effet, lorsque E1 est exprimée seule, elle n'est pas glycosylée efficacement. La séquence en aval de E1, en l'occurrence l'extrémité N-terminale de E2, pourrait améliorer la glycosylation de E1 en créant une pause traductionnelle permettant une glycosylation complète de E1. Alternativement, l'extrémité N-terminale de E2 pourrait imposer une conformation à E1 plus favorable à la N-glycosylation. Cette conformation pourrait être présentée transitoirement avant clivage de la polyprotéine entre E1 et E2 pour retarder le clivage. Ce délai de clivage pourrait être nécessaire à la glycosylation de E1.

Des expériences de mutagenèse dirigée en modèle HCVpp ou HCVcc ont permis d'étudier le rôle fonctionnelle des N-Glycanes associés aux protéines d'enveloppe du VHC. Certains glycanes jouera un rôle important dans la stabilité, le repliement et l'hétérodimérisation, mais aussi dans les interactions entre le VHC et son hôte comme est l'entrée virale (Goffard et al. 2005) et l'immunogénicité de E1 et E2 (Helle et al. 2010; Helle et al. 2007; Falkowska et al. 2007) (

Tableau 6).

Les premières études effectuées sur l'influence des sites de N-glycosylation de E1 et E2 sur l'assemblage et l'entrée du VHC ont été réalisés sur des HCVpp portant des enveloppes mutés sur un seul site de N-glycosylation sur E1 ou sur E2. La caractérisation de ces mutants par rapport à leur infectivité a permis de définir trois phénotypes: le premier groupe (E1N3, E2N3, E2N5, E2N6, E2N7 et E2N9) avec une infectivité des mutants proche de celle du type sauvage, le deuxième groupe (E1N1, E1N2, E1N4, E2N1 et E2N11) présentant une infectivité réduite de plus de 50% par rapport au type sauvage, et le troisième groupe (E2N2, E2N4, E2N8 et E2N10) non infectieux. L'absence d'infectivité de mutants E2N8 et E2N10 serait due à l'absence d'incorporation de l'hétérodimère E1E2 dans les HCVpp. En revanche, l'absence d'infectivité de mutants E2N2 E2N4 indiquerait l'importance dans le contrôle de l'entrée. Au total, certains glycanes des glycoprotéines d'enveloppe du VHC jouent un rôle majeur dans le repliement des protéines et d'autres dans l'entrée du VHC (Goffard et al. 2005).

Autrement, les expériences de neutralisation démontrent que plusieurs glycanes réduisent la sensibilité du VHC vis-à-vis des anticorps neutralisants (Falkowska et al. 2007; Helle et al. 2007; Helle et al. 2010). Les glycanes E2N1 et E2N6 réduisent la sensibilité des VHCpp à des anticorps neutralisants et diminuent également l'accessibilité de CD81 à son site d'association sur E2 (Falkowska et al., 2007) et 645 (E2N11) (Helle et al., 2007). Ceci indiquerait que ces glycanes sont proches de la région de E2 interagissant avec CD81 et que cette région est une cible majeure des anticorps neutralisants. De plus, la glycosylation de ces sites, qui protègent le site d'association à CD81 de la neutralisation, est hautement conservée. Ces glycanes contribuent à l'échappement du VHC vis à vis de la réponse immunitaire humorale. (Helle et al., 2007).

Tableau 5: Récapitulatif des travaux effectués sur le rôle des N-glycanes situés sur E1 et E2

	Goffard et al. 2005	Falkowska et al. 2007	Helle et al. 2007	Helle et al. 2010
Provenance de l'enveloppe	Patient H, gt 1a	Patient H77, gt 1a	Patient gt 1a	JFH-1, gt 2a
Mutation sur le site de glycosylation	Asn→Gln	Asn→Ala	Asn→Gln	
Modèle utilisé	HCVpp	HCVpp	HCVpp	HCVcc et HCVpp
Phénomènes étudiés	Repliement, assemblage, et entrée	Assemblage, entrée, neutralisation, interaction avec CD81	Neutralisation et interaction avec CD81	Réplication virale, expression de E1E2, sécrétion virale, infectivité et neutralisation

Tableau 6: Effet des mutations sur les N-glycanes associés à la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHC.

Récapitulatif bibliographique des résultats obtenus à partir d'enveloppes mutées sur un site de glycosylation en rapport à la souche sauvage. Les sites de glycosylation mutés sont notés dans la colonne de gauche et leur position en aa est marquée en parenthèse sous le site muté.

	Goffard et al. 2005	Helle et al. 2010
E1N1 (196)	Défaut du repliement et assemblage ↓Entrée mais maintien de l'infectivité	Défaut d'assemblage
E1N2 (209)	↓Entrée mais maintien de l'infectivité	
E1N3 (234)	-	

E1N4	Défaut du repliement et assemblage	↓assemblage
(305)	↓Entrée mais maintien de l'infectivité	↓faiblement l'entrée

↓ = diminution

Tableau 7 : Effet des mutations sur les N-glycanes associés à la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC.

Récapitulatif bibliographique des résultats obtenues à partir d'enveloppes mutées pour un site de glycosylation. Sur la colonne de gauche est notée en parenthèse la position en aa du site muté.

	Goffard <i>et al.</i> 2005	Falkowska <i>et al.</i> 2007	Helle <i>et al.</i> 2007	Helle <i>et al.</i> 2010
E2N1 (417)	↓Entrée mais maintien de l'infectivité	↓↓↓Entrée ↑Neutralisation ↑∞CD81	↑Neutralisation ↓∞CD811	↑Neutralisation ∞CD811
E2N2 (423)	∅Entrée	∅ Entrée		↑Neutralisation ↓ faiblement l'entrée ∞CD811
E2N3 (430)		↓Neutralisation		∅ Entrée
E2N4 (448)	∅ Entrée	∅ Entrée		↑Neutralisation ↓ faiblement l'entrée ∞CD811
E2N5 (476)	-	↓Neutralisation	-	-
E2N6 (532)		↓Entrée mais maintien de l'infectivité ↑Neutralisation ↑∞CD81	↑Neutralisation ↓∞CD81	↑Entrée ↑Neutralisation ∞CD811
E2N7 (540)	Défaut du repliement et assemblage	↓Neutralisation		↓↓↓Entrée
E2N8 (556)	Défaut du repliement et assemblage ∅ Entrée	∅ Entrée ↓∞CD81		Défaut d'assemblage ∅ Entrée
E2N9 (576)	-	-	-	-
E2N10 (623)	∅ Entrée, Défaut du repliement et assemblage	∅ assemblage		Défaut d'assemblage ∅ Entrée
E2N11 (645)	↓Entrée mais maintien de l'infectivité	↓Entrée mais maintien de l'infectivité	↓Entrée mais maintien de l'infectivité ↓∞CD81 ↓Neutralisation	↓Entrée mais maintien de l'infectivité ↑Neutralisation

↓ = diminution ; ↓↓↓ = diminution drastique (<20%) ; ∅ = blocage ; ↑=augmentation ; ∞=interaction

De manière intéressante, il a été observé qu'une mutation adaptative (N534K) abolissant le sixième site de N-glycosylation de E2 (E2N6) augmenterait l'infectivité des VHCcc (Delgrange et al. 2007).

D'autres études portées sur l'influence de ces glycanes sur la réponse immune autre que l'humoral. Ils suggèrent que le site E2N9 pourrait aider à protéger le virus de la reconnaissance de l'épitope des cellules T. Ainsi, la suppression de ce glycanes peut améliorer la réponse immunitaire cellulaire (P. Li et al. 2007).

III.2.3 Assemblage et repliement

E1 et E2 acquièrent leur conformation secondaire, tertiaire et quaternaire. Les protéines chaperones, calréticuline et BiP (binding protein), interagissent avec les agrégats de E1E2 tandis que la calnexine s'associe avec les complexes E1E2 présentant un état de repliement différent (Amelie Choukhi et al. 1998; J Dubuisson & C M Rice 1996). La calréticuline et BiP sont des protéines retenues dans la lumière du RE alors que la calnexine est une protéine intégrée dans la membrane du RE. Cet assemblage en complexes natifs s'accompagne de la dissociation de la calnexine. Les régions d'interaction impliquées dans l'hétéro-oligomérisation des glycoprotéines d'enveloppe peuvent être localisées au niveau des ectodomains et/ou des domaines transmembranaires de E1 et E2. De plus, une étude réalisée avec des chimères de E1E2 des différents génotypes suggère que la région variable intergénomique (IgVR), la région hypervariable 2 (HVR2), et un autre segment situé dans le domain II de E2 jouerait un rôle dans l'assemblage de E1E2 (Albecka et al. 2010).

Deux types des complexes E1E2 ont été décrits dans la littérature : i) des hétérodimères constitués des protéines natives et stabilisées par des interactions non covalentes (Deleersnyder et al. 1997) assimilés à la forme prébourgeonnante du complexe fonctionnelle (Op De Beeck et al. 2001) ii) des agrégats hétérogènes liés par des ponts disulfures pouvant interagir avec des molécules chaperons (Deleersnyder et al. 1997; J Dubuisson et al. 1994) (Amelie Choukhi et al. 1998; J Dubuisson & C M Rice 1996). Les glycoprotéines E1 et E2 contiennent respectivement 8 et 20 résidus cystéine potentiellement impliqués dans la formation de ponts disulfures intramoléculaires. Ces résidus cystéine ont donc un rôle déterminant dans l'acquisition de la conformation tridimensionnelle (J Dubuisson & C M Rice 1996; J. C. Meunier et al. 1999; Goffard & Jean Dubuisson mars; Goffard et al. 2005). Cependant, la présence de ces ponts disulfures n'est pas requise pour

l'association protéine-protéine ou la stabilisation du complexe E1-E2 (J Patel et al. 1999). La cinétique du repliement des glycoprotéines, en condition non réductrice, a été suivie en contrôlant la formation des ponts disulfures. Une forme oxydée de E1 apparaît lentement uniquement lorsque la glycoprotéine E2 est co-exprimée avec E1 (Dubuisson & Rice 1996). Le repliement de E1 est donc dépendant de la présence de la glycoprotéine E2, suggérant un rôle de chaperonne de E2 pour E1 (Michalak et al. 1997). En revanche, les ponts disulfures intramoléculaires se forment rapidement pour E2, avant le clivage protéolytique E2/NS2, conduisant à la formation d'un état conformationnel partiellement replié en sous-domaine(s) pouvant interagir avec la forme oxydée de E1. Cependant, le réarrangement de E2 en un stade de repliement ultime est dépendant du repliement de E1 (Deleersnyder et al. 1997).

Des travaux récents effectués avec les modèles HCVpp et HCVcc, proposent un scénario où la forme fonctionnelle de E1E2 contiendrait des groupes thiol libres formant de nouveaux disulfures lors d'un événement d'isomérisation au cours de l'entrée du virus (Fraser et al. 2011). Par ailleurs, l'entrée du VHC peut se poursuivre même lorsque 4 à 5 ponts disulfures sont réduits, suggérant une importance relative du réseau de ponts disulfures à l'entrée virale (Fenouillet et al. 2008).

III.2.4 Principaux domaines des protéines E1 et E2

E1 et E2 sont ancrées dans la membrane par leurs domaines transmembranaires C-terminaux. Ces domaines sont reconnues pour être multifonctionnels.

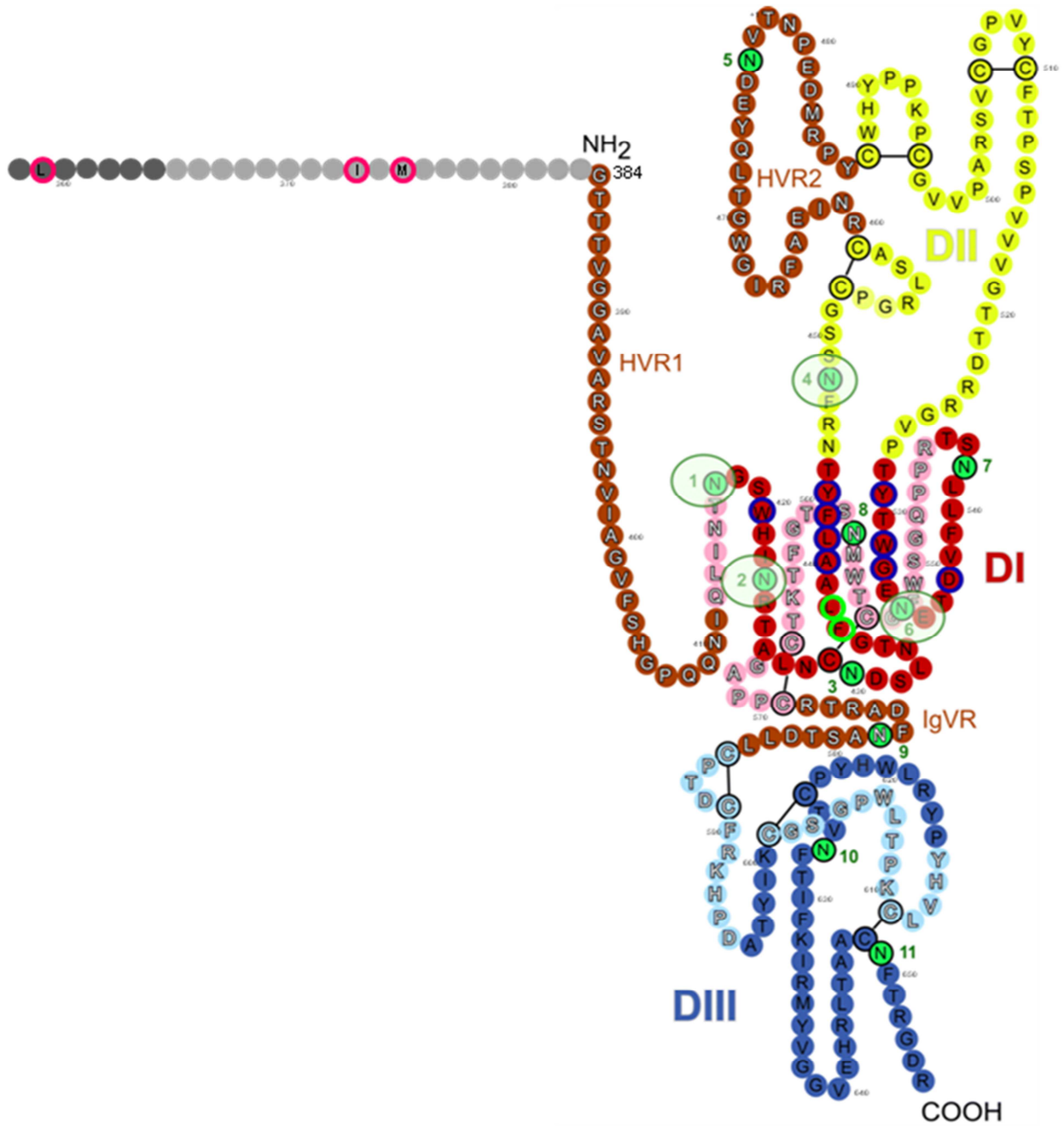


Figure 12 : Représentation schématique de la glycoprotéine E2 du VHC.

La séquence linéaire de l'ectodomaine JFH1 E2 est représentée comme une chaîne de billes marquées avec l'acide aminé correspondant et enfilées sur un pli de classe II (version adaptée du modèle publié par (Thomas Krey et al. 2010)). Les trois domaines putatifs sont présentés en rouge (DI), jaune (DII) et bleu (DIII), les régions variables (HVR1, HVR2 et IgVR) sont indiqués en brun et le DTM en gris (en gris clair le peptide signal.) Les cercles de couleurs pâles et lumineux représentent les résidus situés en arrière. Au premier plan apparaissent les domaines notés en caractères blanc sur noir. Les ponts de disulfure sont indiqués par des barres noires. Les sites de glycosylation sont représentés par des cercles verts numérotés séquentiellement. Les résidus du domaine DI participant à la liaison avec CD81 sont entourés en bleu. Les glycanes affectant la liaison au CD81 sont indiqués par des cercles verts clairs. Les billes grises entourées des cercles fuchsia sont des résidus transmembranaires

identifiés récemment comme étant impliqués dans l'entrée virale (Maurin et al. 2011) [D'après (Francois Helle et al. 2010)].

III.2.4.1 Domaines transmembranaires

Les domaines transmembranaires de E1 et E2 s'étendent respectivement du résidu 353 au résidu 383 (Laurence Cocquerel et al. 1999) et du 718 au 746 (sur la polyprotéine) (Laurence Cocquerel et al. 2000). Ils sont organisés en deux segments hydrophobes séparés par un segment hydrophile présentant un (Lys pour E1) ou deux (Asp et Arg pour E2) résidus chargés très conservés (Ciczora et al. 2005; Laurence Cocquerel et al. 2000). L'existence d'une telle conservation suggère que ces résidus doivent jouer un rôle fonctionnelle important.

La délétion du domaine transmembranaire de E2, remplacé par un signal d'ancrage d'une autre protéine, est suffisante pour abolir la formation de complexes E1E2 (Janisha Patel et al. 2001; Laurence Cocquerel et al. 1998; Michalak et al. 1997; Mark J. Selby et al. 1994)(Laurence Cocquerel et al. 2003). Des expériences de mutagenèse ont permis de rendre compte de l'importance de certains segments (2 pour E1 et 1 pour E2) dans l'efficacité d'assemblage de ces protéines (Op De Beeck et al. 2000). En plus de leur rôle d'ancrage membranaire et de d'adressage, ces domaines sont responsables de la rétention des hétérodimères E1E2 dans le RE (Laurence Cocquerel et al. 1998; Laurence Cocquerel et al. 1999; Laurence Cocquerel et al. 2000). En effet, les segments localisés près des résidus chargés des domaines transmembranaires de E1 et E2 et le segment localisé proche de la glycine 358 (position sur la polyprotéine) du domaine transmembranaire de E1, seraient directement impliqués dans la formation des hétérodimères E1E2 (Op De Beeck et al. 2000). Ils sont également impliqués dans l'entrée virale (Ciczora et al. 2005). Tandis qu'un motif très conservé de type GXXXG en position N-terminale du domaine transmembranaire de E1 a été impliqué dans la dimérisation des hélices alpha transmembranaires des protéines transmembranaires (Russ & Engelman 2000), une autre séquence, proche de la membrane et répétée au niveau de la séquence de la glycoprotéine E2 a été décrite comme indispensable à la dimérisation et à l'entrée virale. Il s'agit notamment des résidus Leu⁶⁷⁵, Ser⁶⁷⁸, Leu⁶⁸⁹ et Leu⁶⁹² (H. E. Drummer & Pountourios 2004).

Un travail récent consistant en générer des chimères d'hétérodimères E1E2, interchançant les séquences de E1 et E2 des souches H77 (gt1a) et Con1 (gt 1b), montre que les deux ectodomaines et les deux DTM contribuent aux changements de conformation nécessaires à l'entrée. Il a été souligné le rôle essentiel des aa 359, 373, et 375 dans l'entrée virale. L'extrémité N-terminale de E1, et le DTM de E1 ne sont pas interchangeables. Cette

interaction est cruciale pour l'entrée de chimères H77/JFH1 HCVcc et dépendante du génotype mais elle n'est pas cruciale pour la souche Con1. Ainsi, les interactions spécifiques entre E1 et E2 varient entre les souches (Maurin et al. 2011).

La mutation de certains résidus des DTM de E1 et de E2 altérerait la propriété de fusion de ces glycoprotéines d'enveloppe suggérant qu'ils jouent également un rôle majeur dans le mécanisme de fusion (Ciczora et al. 2007).

La présence d'une séquence d'ancrage et d'une fonction séquence signal séparée par des résidus chargés dans les domaines transmembranaires de E1 et E2 suggère que ces domaines traversent deux fois la membrane avec les résidus chargés orientés vers le cytosol. Cependant, les deux séquences hydrophobes présentes dans les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont trop courtes pour former des hélices alpha transmembranaires. En fait, il semblerait que les domaines transmembranaires de E1 et E2, avant clivage de la polyprotéine par les signaux peptidases cellulaires, adoptent une conformation transitoire en épingle à cheveux (Figure 13) à l'intérieur même du translocon, exposant à la fois leurs extrémités N- et C-terminale sur la face luminale du RE. Ce translocon, assimilé à un canal, est impliqué dans la reconnaissance, l'orientation, le mouvement latéral et l'insertion des séquences transmembranaires.

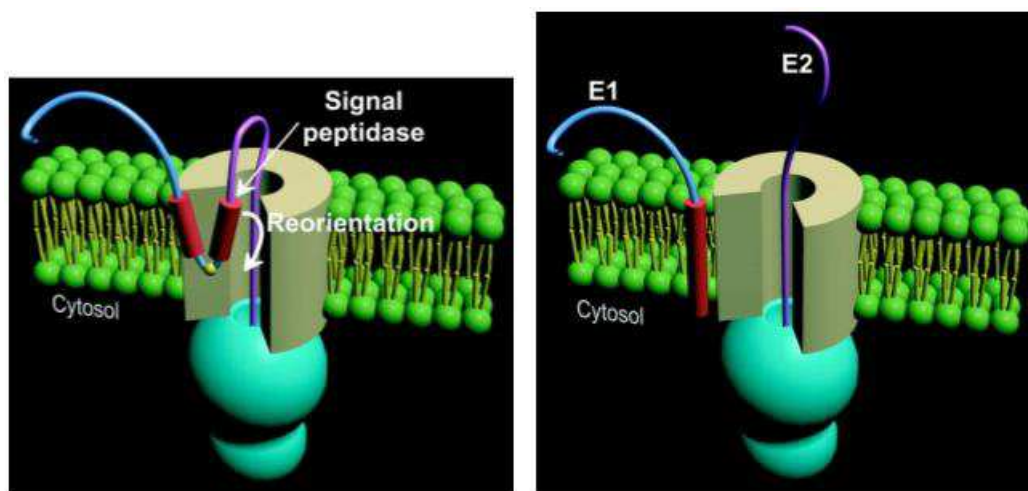


Figure 13: Réorganisation des DTM de E1 et E2.

Durant leur synthèse les DTM de E1 et E2 adoptent une structure en « épingle à cheveux » (image à gauche). Après clivage entre les protéines, il y a une restructuration des DTM qui adoptent une topologie à un seul passage transmembranaire (image à droite). (D'après Penin et al. 2004)

Après le clivage protéolytique, les charges portées par les résidus localisés au centre des domaines transmembranaires sont probablement neutralisées par l'environnement

membranaire hydrophobe. Ainsi, ces domaines se réorientent en un seul segment transmembranaire où l'extrémité C-terminale des protéines est amenée vers le cytosol. De plus, la présence en *cis* de la glycoprotéine E1 est nécessaire à l'ancrage membranaire de la glycoprotéine E2, indiquant que l'intégration membranaire des glycoprotéines s'effectue préférentiellement après l'oligomérisation de leurs domaines transmembranaires (Laurence Cocquerel et al. 2001).

III.2.4.2 Régions hypervariables: HVRs et RIg

La variabilité génétique n'est pas distribuée de façon homogène à l'échelle génomique, en raison du rôle fonctionnel des différentes protéines et de la pression exercée sur les domaines fonctionnels. Ainsi, plus la pression immunitaire est élevée sur un domaine et plus la variabilité génétique augmente (Reed & C M Rice 2000). La région codant pour E1 et E2 est la plus variable du génome du VHC (Peter Simmonds et al. 2005; Peter Simmonds 2004). Les protéines d'enveloppe du VHC participent au mécanisme d'entrée dans la cellule. Elles sont donc particulièrement exposées au système immunitaire de l'hôte. Elles sont également leur cible principale lors de l'infection par le VHC (Boulestin et al. 2002; S. Saito et al. 1996). E1 et E2 présentent des taux de variation élevés lors des phases de réplication active correspondant aux périodes de stimulation immunitaire intense. La protéine E1 possède une région modérément variable (aa 215-255). La présence de régions hypervariables dans la protéine E2, notée HVR1 (aa 384-410) (A J Weiner et al. 1991) et HVR2 résidus (aa 474-482) (Nobuyuki Kato et al. 1992) (A. T. Yagnik et al. 2000; Shirai et al. 1999), et HVR3 (aa 431-466) (Troesch et al. 2006). Elles joueraient un rôle dans l'entrée virale (R. Roccasecca et al. 2003). La variabilité génétique observée dans ces régions hypervariables pourrait refléter capacité de génération de mutants d'échappement comme une conséquence de la réponse immunitaire (D. R. Taylor et al. 1999). Il faut noter que les régions dites hypervariables présentent néanmoins des propriétés biochimiques et structurales conservées d'un génotype à l'autre (Francois Penin et al. 2001). De façon générale, la région HVR1 est constituée de plusieurs aa basiques pouvant moduler l'infectivité du VHC (Callens et al. 2005).

Des travaux récents suggèrent que HVR2 avec la région variable intergénomique (RVIg), sont essentielles pour l'intégrité structurale et la fonction de l'hétérodimère E1E2 (Albecka et al. 2010; Kathleen McCaffrey et al. 2011)

III.2.4.3 Domaines des fusions

Une étape obligatoire de l'entrée virale des virus enveloppés est le processus de fusion membranaire entre la membrane virale et la membrane de la cellule cible. Cet événement doit permettre de délivrer la nucléocapside virale dans la cellule cible pour initier une infection productive. La fusion membranaire se réalise grâce à des protéines de fusion, présentes à la surface du virus, caractérisées par la présence d'au moins deux séquences hydrophobes, un peptide de fusion et un domaine transmembranaire. Les protéines de fusion sont d'abord exprimées en tant que précurseurs inactifs qui restent piégées dans une conformation métastable, en protégeant le peptide de fusion de l'environnement extérieur. Un déclencheur biochimique spécifique doit permettre d'exposer le peptide de fusion pour son insertion dans la membrane de la cellule cible. Les différents déclencheurs peuvent être un pH acide (Skehel & D. C. Wiley 2000), une liaison spécifique à un récepteur (Mothes et al. 2000), un clivage dans l'endosome (Chandran et al. 2005), ou la réduction des ponts disulfures (Kejun Li et al. 2008) Après l'insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire, la protéine de fusion se replie dans une conformation d'énergie plus faible, pour rapprocher les membranes virale et cellulaire. La fusion passe alors par trois phases distinctes: un mélange des lipides, une formation de pores, et une expansion des pores dans la membrane cellulaire (Weissenhorn et al. 2007).

La fonction de E1 lors de l'entrée du virus n'est pas connue avec précision, alors que celle de E2 semble liée à l'attachement aux récepteurs de surface cellulaire. Un certain nombre de domaines hydrophobes ont été identifiés dans les protéines E1 et E2, mais leur activité de peptide de fusion reste incertaine. Vu la difficulté que représente la modélisation de la structure du VHC, plusieurs auteurs ont utilisé les données structurales d'autres glycoprotéines virales dans la famille des *Flaviviridae*. La protéine E d'enveloppe du Virus de l'Encéphalite à Tiques (TBEV) a été utilisée comme modèle pour prédire la structure de E2. (A. T. Yagnik et al. 2000; Garry & Dash 2003). Certaines études suggèrent que le peptide de fusion ne serait pas dans E2 mais dans E1. En effet, des séquences particulières contenues dans la protéine E1 présentent des similitudes avec le peptide de fusion des *Flavivirus* et des *Paramyxovirus* (Mike Flint & Jane A. McKeating 1999). Il n'est pas exclu que les deux protéines E1 E2 puissent être impliquées dans le processus de fusion. Une région de E1 participerait également à la fusion. Elle est située entre les résidus 270 à 284 et deux régions de E2 correspondant aux résidus 416 - 430 et 600 - 620 (Dimitri Lavillette et al. 2007). D'autre part, la mutation de certains résidus des domaines transmembranaires de E1 et E2 altère la

propriété de fusion (Ciczora et al, 2007). Récemment, un modèle de structure tridimensionnelle a suggéré que E2 serait une protéine de fusion de classe II (Thomas Krey et al. 2010) par homologie à d'autres protéines issues de Flavivirus. Toutefois, E1 et E2 possèderaient des domaines impliqués dans la fusion (A. M. Owsianka et al. 2006; Dimitri Lavillette et al. 2007).

Les résidus en position 359, 373 et 375 situés dans le DTM de E2 semblent jouer un rôle à l'étape d'entrée du VHC (Maurin et al. 2011). L'insertion d'une leucine dans la position 682 affecte spécialement la fusion, ce qui peut suggérer une proximité avec les éléments engagés avec le mécanisme de fusion (Rychłowska et al. 2011).

III.2.4.4 Motif PePHD

Dans des travaux réalisés *in vitro* Taylor *et al* ont montré que E2 possédait un domaine de 12 aa (nommé PePHD) capable de se lier à la PKR. La glycoprotéine E2 de type a se comporterait comme un pseudo-substrat capable d'inhiber l'activité kinasique de la PKR. L'hypothèse de cette interaction via PePHD a été proposée pour expliquer la résistance intrinsèque du génotype 1 à l'IFN (D. R. Taylor et al. 1999).

Quelques études ont été menées sur le polymorphisme de la région PePHD chez les patients porteurs de souches de génotypes 1, 2 et 3. Plusieurs travaux portant exclusivement sur la diversité de PePHD du VHC de génotype 1b avant traitement ont montré une grande conservation du motif, quelque soit le type de réponse (Gerotto et al. 2000; K Chayama et al. 2000; Hung et al. 2003; Gaudy et al. 2005). Plus récemment, Yokozaki et al. n'ont pas retrouvés d'association entre un profil mutationnel de PePHD et la réponse à l'IFN (Yokozaki et al. 2011).

III.2.5 Résidus impliqués dans les mécanismes d'entrée virale

L'attachement des virions à la surface de la cellule est la première rencontre du virus avec la cellule hôte et cette étape représente la cible majeure des anticorps neutralisants.

III.2.5.1 Interaction avec les récepteurs

La glycoprotéine E2 contient des domaines spécifiques importants pour son interaction avec CD81 (Figure 14).

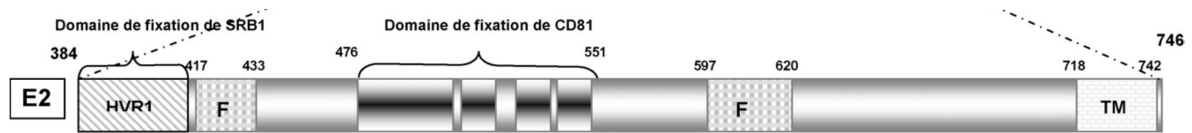


Figure 14 : Représentation schématique des sites fonctionnels de la glycoprotéine E2

F : domaine de fusion ; TM : domaine transmembranaire ; (S Fafi-Kremer et al. 2008)

Le site de E2 responsable de l'interaction avec CD81 serait conformationnelle (Mike Flint et al. 1999; K G Hadlock et al. 2001; H. E. Drummer et al. 2006). Des études réalisées avec des hétérodimères E1E2 ou des VLP ont identifié plusieurs déterminants : aa 412-447 (A Owsianka et al. 2001; M. Hsu et al. 2003; Kathleen McCaffrey et al. 2007) , aa 480-493 (Mike Flint et al. 1999; Arvind H. Patel et al. 2000; A Owsianka et al. 2001) , aa 528-535 (A Owsianka et al. 2001; A. T. Yagnik et al. 2000) , aa 544-551 (Mike Flint et al. 1999; A Owsianka et al. 2001) , et aa 613-618 (R. Roccasecca et al. 2003; A. T. Yagnik et al. 2000). Les régions HVR1 et HVR2 pourraient moduler l'accessibilité du site d'interaction avec CD81 (R. Roccasecca et al. 2003). La région localisée entre HVR1 et HVR2, (G436WLAGLFY), serait impliquée dans l'interaction des VHCpp avec CD81 (H. E. Drummer et al. 2006). Ce motif, présentent les caractéristiques du peptide de fusion de type II. Il pourrait participer indirectement à une interaction avec CD81 et les résidus 437, 438, 441 et 442 contribueraient directement au site d'association avec CD81 (H. E. Drummer et al. 2006). Une étude par mutagenèse de E2 dans le contexte des VHCpp a également permis d'identifier les résidus participant à l'interaction de E2 avec CD81 (420, 527, 529, 530 et 535) (A. M. Owsianka et al. 2006). A l'opposé des résultats obtenus avec la sE2, les hétérodimères E1E2 et les VLP, cette étude a montré que la région entre les résidus 474 et 495 ne participait pas directement de l'association entre E2 et CD81 (Owsianka et al., 2006). L'importance des résidus Trp437-Leu438-Leu441-Phe442 et Tyr527-Trp529-Gly530-Asp535 de E2 et Ile181-Ile182-Leu185-Phe186 de CD81 pour l'association E2-CD81 indique que l'interaction est de type hydrophobe. (H. E. Drummer et al. 2006; A. M. Owsianka et al. 2006).

Les résidus en position 359, 373 et 375 situés dans le DTM de E2 semblent jouer un rôle à l'étape d'entrée du VHC (Maurin et al. 2011). L'insertion d'une leucine dans la position 682 affecte spécialement la fusion, ce qui peut suggérer une proximité avec les éléments engagés avec le mécanisme de fusion (Rychłowska et al. 2011).

Une séquence de la glycoprotéine E2 a été décrite comme indispensable à la dimérisation et à l'entrée virale, notamment les résidus Leu⁶⁷⁵, Ser⁶⁷⁸, Leu⁶⁸⁹ et Leu⁶⁹² (Drummer & Pountourios, 2004).

III.3. Modélisation de l'entrée du VHC

III.3.1 Attachement

Les hépatocytes sont des cellules hautement polarisées : le pôle basolatéral, en contact avec les capillaires sinusoides, est responsable de la sécrétion des protéines sériques, tandis que le pôle apical, en contact avec les canalicules biliaires, est responsable de la sécrétion de bile. Le VHC entre dans le foie probablement par les capillaires sinusoides, accédant d'abord aux pôles basolatéraux des hépatocytes.

Après interaction du virus et des récepteurs à la face basolatérale, les complexes virus-récepteurs pourraient alors migrés vers les jonctions serrés, vers la face apicale, où l'interaction avec les claudines permettrait l'endocytose (Meertens et al. 2008).

III.3.2 Internalisation

L'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes, tels que la bafilomycine A1, la concanamycine A ou le chlorure d'ammonium, a démontré que l'entrée des VHCpp (B. Bartosch et al. 2003; M. Hsu et al. 2003) et des VHCcc (Blanchard et al. 2006; Koutsoudakis et al. 2006) était dépendante du pH. Ceci suggère que le VHC entrerait dans les cellules cibles par endocytose. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou d'ARN interférants a permis de montrer que l'entrée du VHC se déroule *via* une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard et al. 2006; Meertens et al. 2006). L'utilisation de mutants dominants-négatifs des petites GTPases Rab5 et Rab7, respectivement impliquées dans le transport vers les endosomes précoces et vers les endosomes tardifs, suggère que le VHC fusionne avec les endosomes précoces (Meertens et al. 2006). Plus récemment, le rôle des microtubules dans le trafic intracellulaire du VHC, a été évoqué suite à son internalisation par endocytose (Roohvand et al. 2009). Cependant en utilisant des inhibiteurs des échanges sodium/potassium ou des réarrangements de l'actine (Silverman *et al.*, O7.03 au 18th symposium on HCV and related virus). propose un mécanisme d'entrée par pinocytose.

III.3.3 Fusion

Une étape obligatoire de l'entrée virale des virus enveloppés est le processus de fusion entre la membrane virale et la membrane de la cellule cible pour libérer la nucléocapside virale dans la cellule cible. La fusion membranaire se réalise par médiation des protéines de fusion virales présentes à la surface des virus enveloppés qui sont caractérisées par la

présence d'au moins deux séquences hydrophobes : un peptide de fusion et un domaine transmembranaire. Les protéines de fusion sont d'abord exprimées en tant que précurseurs inactifs qui restent piégés dans une conformation métastable, en protégeant le peptide de fusion de l'environnement extérieur. Un déclencheur biochimique spécifique active le complexe glycoprotéine en même temps que le peptide de fusion est exposé et inséré dans la membrane des cellules cibles. Les différents déclencheurs sont un pH bas (Skehel & D. C. Wiley 2000), la liaison du récepteur (Mothes et al. 2000), un clivage endosomal (Chandran et al. 2005), ou de l'isomérisation des groupes disulfure (Kejun Li et al. 2008). Après l'insertion du peptide de fusion dans la membrane des cellules cibles, la protéine de fusion replie dans une conformation d'énergie plus faible, attirant ainsi les membranes virales. La fusion passe alors par trois phases distinctes: le mélange des lipides, la formation et l'expansion des pores (Weissenhorn et al. 2007).

L'utilisation des HCVpp et des HCVcc a permis de montrer que l'entrée du VHC est dépendante du pH. Pour de nombreux virus enveloppés, le pH acide active un changement conformationnel irréversible nécessaire à l'événement de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomal. Ces virus sont généralement inactivés par un traitement préalable à pH acide. Cependant, un tel traitement n'a pas d'effet sur l'infectivité des particules, suggérant que des événements post-attachement conduisent le VHC vers une conformation sensible au pH (Meertens et al. 2006; Tscherne et al. 2006). La fusion serait dépendante de la température (Dimitri Lavillette et al. 2006). Elle ne nécessite pas la présence de protéines à la surface des liposomes mais pourrait être facilitée en présence de cholestérol (Haid et al. 2009). La région de E1 correspondant aux résidus 270 à 284 et deux régions de E2 correspondant aux résidus 416 à 430 et 600 à 620 participeraient à ce mécanisme de fusion *in vitro* du VHC (Dimitri Lavillette et al. 2007). D'autre part, la mutation de certains résidus des domaines transmembranaires de E1 et E2 altérerait leur capacité de fusion de ces glycoprotéines d'enveloppe (Ciczora et al. 2007). Une étude récente suggère que CD81 initie une fusion indépendante du pH (N. R. Sharma et al. 2011)

IV. Contrôle de l'infection par le système immunitaire

IV.1. Réponse immunitaire innée

Elle constitue une première ligne de défense antivirale et conditionne également la qualité de la réponse immunitaire adaptative qui a lieu secondairement. Dans le foie, la réponse innée est médiée par les cellules Natural killer (NK), les cellules NKT, les cellules de Kupffer (macrophages du foie). La réponse à l'interféron est exercée par les cellules hépatiques infectées. Les cellules NK et NKT effectuent une lyse cytotoxique des cellules infectées en libérant des granules contenant la perforine et des protéases. Elles produisent aussi une grande quantité de l'IFN gamma de type II et TNF alpha (α). Chez le chimpanzé, les cellules NK jouent un rôle important dans l'élimination du VHC, en l'absence de réponse médiée par les lymphocytes T spécifiques (M. Thomson et al. 2003). Un dysfonctionnement de la cytotoxicité des cellules NK intra-hépatiques pourrait contribuer à l'établissement de la persistance (Varchetta et al. 2012). L'interaction entre la protéine d'enveloppe E2 du VHC et la molécule CD81, présente à la surface des cellules NK, semble diminuer la cytotoxicité ces dernières (Crotta et al. 2002). Lors d'une infection chronique par le VHC, une diminution de l'expression des récepteurs des cellules NK (NKR), associée à un affaiblissement de leur fonctions a été décrite (J Nattermann et al. 2006).

L'activation des interférons de type I, l'IFN α et β , joue un rôle important dans le système de défense précoce de l'infection virale. Les cellules de l'hôte reconnaissent ces ARN *via* les Toll like receptor 3 (TLR-3) (Alexopoulou et al. 2001). Une étude a montré que des souris dépourvues des gènes codant pour l'IFN α et β ne guérissaient pas de l'infection par le VHC (Steinhoff et al. 1995). Lors de l'infection aiguë du VHC, l'induction de la protéine kinase ARN double-brin-dépendante (PKR), de l'oligoadénylate synthétase 2'-5' (OEA) et des gènes Mx, jouent un rôle important dans l'inhibition de la réplication du VHC et l'induction de l'apoptose des hépatocytes infectés (Bigger et al. 2001).

L'induction d'IFN est déclenchée en réponse à l'infection par de nombreux virus à ARN par la reconnaissance du génome viral par l'ARN hélicase cellulaire RIG-I qui interagit avec la protéine adaptatrice MAVS, puis recrute des kinases requises pour l'induction d'IFN. Le VHC induit faiblement l'IFN quand RIG-I reconnaît son ARN. Cette faible induction d'IFN est due au recrutement de MAVS par le VHC de façon très précoce *via* la protéine kinase cellulaire PKR, et non *via* RIG-I, qui induit une série de gènes, dont ISG15, qui bloque

la fonction de RIG-I (Arnaud et al. 2011). Le VHC utilise d'autres mécanismes pour éviter la mise en place de la réponse immune innée. Sa protéase NS3/4A clive MAVS en abrogeant ainsi la voie d'induction de l'IFN (Meylan et al. 2005). Pendant la réplication du VHC, la production d'ARN doubles brins intermédiaires activent la protéine cellulaire PKR par liaison avec une eIF2 α -kinase, pour inhiber les traductions des ARNs messagers dépendants du facteur d'initiation eIF2 α , dont ceux de l'IFN (Arnaud et al. 2011) et ceux des gènes induits par l'IFN (ISGs) (Garaigorta & Francis V Chisari 2009).

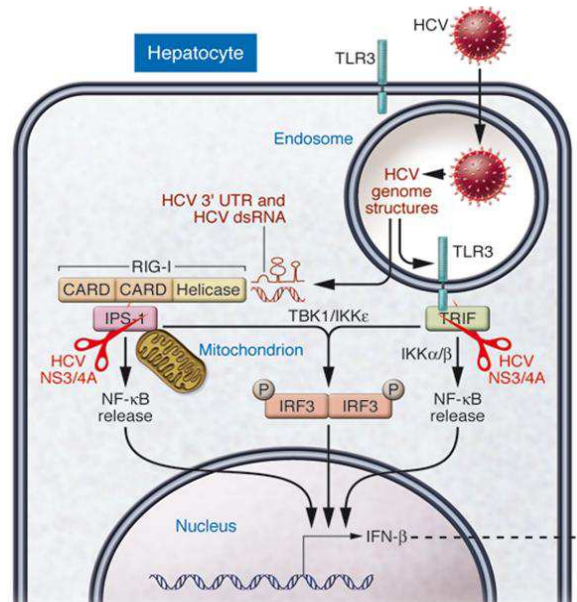


Figure 15 : Atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte par le VHC

Les hépatocytes détectent l'ARNdb du VHC par le biais des structures RIG-I et TLR3. Ces récepteurs activent via leurs molécules adaptateur IPS-1(MAVS) et FTBC respectivement, le facteur NF- κ B (Barbara Rehermann 2009).

La fonction des cellules dendritiques (CD) est d'amorcer et d'orienter la réponse adaptative grâce à leur capacité à reconnaître, à l'aide des récepteurs de type PRR (*pattern recognition receptors*), un nombre restreint de structures moléculaires propres aux micro-organismes et communes à de nombreux agents pathogènes. La stratégie de ces sentinelles n'est pas de reconnaître toute la gamme des millions de motifs antigéniques existants mais un petit nombre d'entre eux. Cette information est intégrée afin d'aider le système adaptatif à faire la distinction entre peptides du soi et peptides dangereux. Le virus de l'hépatite C interromp la signalisation en aval de certains PRR. Ceci lui permet d'échapper à la détection par l'immunité innée et d'inhiber la capacité des CD à stimuler une réponse adaptative antivirale. L'infection des cellules dendritiques (CD) par le VHC pourrait altérer leur capacité à activer les lymphocytes T, favorisant ainsi la persistance (Jacob Nattermann et al. 2006). De

plus, E2 aurait la capacité d'interagir avec les lectines de type DC-SIGN (Lozach et al. 2003), agissant au niveau de l'adhésion cellulaire et de l'identification des pathogènes (Laurence Cocquerel et al. 2006).

IV.2. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Plusieurs études ont montré que l'élimination du VHC est associée à une réponse T CD4+ et T CD8 + efficace ciblant plusieurs épitopes dans les différentes protéines du VHC (H M Diepolder et al. 1997; R Thimme et al. 2001; Day et al. 2002; A. L. Cox et al. 2005; Lechner et al. 2000; S Cooper et al. 1999). En 6 à 8 semaines, les réponses médiées par les lymphocytes T deviennent détectables. Après de la guérison de l'infection, ces réponses persistent pendant des décennies (Takaki et al. 2000).

Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent les antigènes viraux après présentation par le CMH de classe I sur les cellules présentatrices d'Ag et les cellules cibles infectées. Leur activité antivirale associe la cytotoxicité et la sécrétion des cytokines antivirales comme l'IFN γ . Le rôle de la réponse cellulaire spécifique T CD8 + dans l'élimination du VHC a été montrée dans plusieurs travaux (S Cooper et al. 1999; Grüner et al. 2000; Lechner et al. 2000; R Thimme et al. 2001; A. L. Cox et al. 2005) (Figure 16).

Les lymphocytes T CD8 + reconnaissant les antigènes présentant les molécules HLA de classe I. Il a été suggéré que certains allèles seraient associés soit à la clairance virale soit à la chronicité de l'infection (Thio et al. 2002; Neumann-Haefelin et al. 2006; Neumann-Haefelin et al. 2010; Kuniholm et al. 2010; Fitzmaurice et al. 2011). Par exemple, le rôle de certains allèles du HLA dans l'histoire naturelle a été montré dans une cohorte de femmes irlandaises infectées par une souche unique de VHC de gt 1b. Les allèles A3, B27 et Cw*01 ont été identifiés en cas de guérison alors que l'allèle B8 a été plutôt retrouvé en cas d'évolution vers la chronicité (S. M. McKiernan et al. 2004). *In vitro*, les lymphocytes T CD8+ spécifiques du VHC exercent de puissants effets antiviraux principalement par l'induction l'IFN- γ (Jo et al. 2009; Jo et al. 2011). *In vivo*, les cellules T CD8 + auraient un rôle déterminant dans le contrôle de la réplication du VHC. Pendant la phase aigüe de l'infection menant à la guérison, la réponse T CD8+ est vigoureuse, ciblant de nombreuses épitopes. A l'inverse, lors que l'infection devient chronique, cette réponse est faible et cible un nombre limité d'épitopes (Figure 16). Après déplétion des lymphocytes T CD8 +, Shoukry et al ont démontré que l'infection expérimentale d'un chimpanzé était suivie d'une infection

persistante par le VHC jusqu'à la récupération d'une réponse des lymphocytes T CD8 + (Shoukry et al. 2003). Selon certains auteurs, la sélection des variants mineurs échappant à la réponse des cellules T CD8+ faciliterait la persistance de l'infection par le VHC (chang 1997 et weiner 1995). En effet, la persistance de la virémie a été associée à la présence des mutations d'échappement dans les épitopes restreints par le CMH de classe I (Joerg Timm et al. 2004; Tester et al. 2005; A. L. Cox et al. 2005).

Lors de la réponse immunitaire antivirale, les cellules T CD4+ ont des fonctions effectrices comme l'activation des cellules B et T CD8+ et la production des cytokines antivirales. La réponse médiée par les cellules T CD4+ spécifiques du VHC, contribueraient à la clairance du VHC. Plusieurs études ont associé l'infection aiguë par le VHC avec la présence d'une réponse T CD4+ de forte intensité, polyclonale et soutenue dans le temps (H M Diepolder et al. 1996; H M Diepolder et al. 1997; J T Gerlach et al. 1999; Day et al. 2002; Schulze zur Wiesch et al. 2005). En cas d'inefficacité de la réponse T CD4+ (Figure 16), l'infection devient persistante (Day et al. 2002). En l'absence d'une réponse T CD4+, les cellules T CD8+ et les anticorps neutralisants ne parviennent pas à contrôler la virémie (D. E. Kaplan et al. 2007). Certains allèles HLA de classe II influenceraient l'évolution de l'infection par le VHC (S. M. McKiernan et al. 2004; Hong et al. 2005). Ainsi Hong *et al.* ont décrit l'association des certains allèles du HLA de classe II (DRB1*1101, DQB1*0301) avec l'élimination virale (Hong et al. 2005)

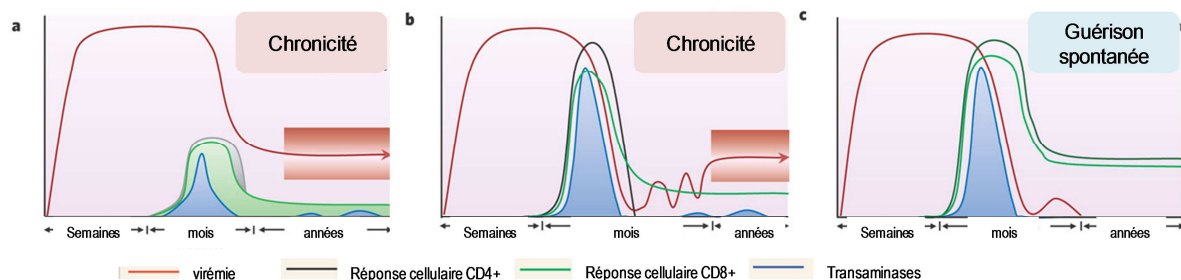


Figure 16: Représentation schématique de l'évolution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire après une primo-infection par le VHC.

D'après (Bowen & Christopher M. Walker 2005)

La persistance du VHC pourrait s'expliquer par un déficit quantitatif et fonctionnel de la réponse T CD8+. L'expression déficiente des NKR a été associée à ce déficit (J Nattermann et al. 2006).

V. Réponse humorale neutralisante

La réponse immunitaire à médiation humorale dirigée contre le VHC se traduit par la production d'un panel d'anticorps dirigés contre les différentes protéines virales (structurales et non structurales). Les différents profils observés sur les immunoblots dédiés au dépistage de l'infection pour le VHC en attestent (Uyttendaele et al. 1994; F Dubois et al. 1998; Maniez-Montreuil & F Dubois 2000). Seule une petite fraction de ces anticorps ont une activité neutralisante.

V.1. Modèles et principes d'étude de la réponse anticorps

V.1.1 Modèles animaux

Naturellement, le VHC infecte uniquement l'humain. Expérimentalement, le chimpanzé est le seul modèle animal naturel d'étude de l'infection par le VHC *in vivo* (Francis V. Chisari 2005). Il a permis d'étudier de nombreux aspects de la réponse immunitaire adaptative (Jens Bukh 2004) (Jens Bukh 2012). Mais, le coût élevé et les contraintes liées à la manipulation du chimpanzé, associé à l'absence de système de culture jusqu'en 2005 pour le VHC ont empêché longtemps une analyse plus approfondie du pouvoir neutralisant des Ac anti-VHC. Le modèle de souris SCID-uPA (Mercer et al. 2001) a été développé. Il s'agit de souris chimériques immunodéprimés transplantées avec des hépatocytes humains, ce qui les rend infectables par le VHC (Mercer et al. 2001; Brett D Lindenbach et al. 2006). Ces souris étant immunodéficientes, elles ont été utilisées pour étudier la neutralisation du virus après transfert passif d'immunoglobulines polyclonales de patient porteur chronique (Vanwolleghem et al. 2008), d'Ac monoclonaux (Law et al. 2008) et d'anticorps anti-récepteurs anti-CD81 (Meuleman et al. 2008). Plus récemment, Dorner *et al.* ont développé un modèle de souris humanisées immunocompétentes. Il a été initialement utilisé pour étudier les mécanismes d'entrée virale et pour explorer l'immunité humorale induite par l'injection d'un virus recombinant de la vaccine exprimant les protéines C-E1-E2-p7-NS2. Après vaccination, une protection vis-à-vis d'une infection par une souche hétérologue a été observée chez certains animaux : elle a été corrélée avec le taux sérique d'anticorps anti-E2 (Dorner et al. 2011).

V.1.2 Modèle d'infection *in vitro*

Le développement de modèles d'infection *in vitro* a permis l'étude de différents aspects de l'interaction virus/cellules et celle de la réponse humorale dirigée contre le VHC. Initialement des glycoprotéines d'enveloppe solubles et chimériques ont servi au criblage d'Ac inhibant l'attachement du VHC aux cellules cibles (Rosa et al. 1996). Les particules pseudovirales, *virus-like particles* (VLP), sont des particules s'assemblant de manière autonome dans des cellules d'insectes ou de mammifères. Elles ont permis l'étude de la neutralisation de la liaison aux cellules cibles (Thomas F. Baumert et al. 1998). En raison de leurs propriétés antigéniques communes avec le VHC, elles ont été utilisées pour la détection d'Ac spécifique et testées comment des candidats vaccin (Thomas F. Baumert et al. 1998; Lechmann et al. 2001; Xiang et al. 2002; Qiao et al. 2003; D. Steinmann et al. 2004; Garrone et al. 2011). Très récemment, il a été démontré que l'utilisation de VLP insérant le gène *gag* rétroviral et « pseudotypés » avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et /ou E2 (Garrone et al. 2011) induirait, chez la souris et le macaque, un titre élevé d'anticorps anti-E1 et / ou anti-E2, ainsi que des Ac neutralisants vis-à-vis de souches de différents génotypes du VHC (1b, 2a, 2b, 4 et 5).

Des pseudoparticules rétrovirales portant des glycoprotéines du VHC (HCVpp) ont été le premier système performant et flexible permettant d'étudier toutes les fonctions virales dépendantes des glycoprotéines d'enveloppe E1E2, notamment la neutralisation de son entrée par des anticorps. Elle s'obtiennent par incorporation des glycoprotéines fonctionnelles du VHC à la surface de particules rétrovirales exprimant la capsid du MLV ou du VIH (Birke Bartosch, Jean Dubuisson, et al. 2003; M. Hsu et al. 2003; H. E. Drummer et al. 2003). Le principe de production est détaillé au paragraphe XV). Ce modèle est considéré comme un outil de référence pour étudier les propriétés des glycoprotéines E1E2.

Le modèle des virions infectieux produits en culture cellulaire (HCVcc), est basé sur la transfection des ARNs d'un variant du VHC de génotype 2a, dénommé JFH-1, dans un sous-clone de cellules hépatocytaires adaptées pour répliquer efficacement le génome du VHC (Takaji Wakita et al. 2005; Brett D Lindenbach et al. 2005; J. Zhong et al. 2005). La production d'HCVcc de génotypes différents est possible par l'utilisation de clones chimères (MinKyung Yi et al. 2006). Ce système nécessite une manipulation en confinement L3 et ne permet d'étudier qu'un nombre restreint des variants viraux.

V.1.3 Tests de neutralisation

Initialement, l'étude *in vitro* des interactions virus-anticorps et virus-cellules se basaient sur la production de la protéine E2 soluble, recombinante, tronquée ou entière dans des cellules de mammifères. Ce système a permis l'identification des premiers candidats récepteurs cellulaires pour le VHC, à savoir la molécule CD81 (Pileri et al. 1998). Sur la base de cette découverte, la détection d'Ac neutralisants pouvait être réalisée en étudiant la liaison d'E2 aux cellules Molt-4 exprimant CD81 (test NOB / Neutralizing Of Binding) (Rosa et al. 1996; Mike Flint et al. 1999).

Par la suite, les VLP générées dans des cellules d'insectes ont été utilisées pour étudier les phénomènes de neutralisation (Thomas F. Baumert et al. 1998). En effet, l'activité neutralisante d'un panel d'anticorps monoclonaux vis-à-vis de VLP et de protéine E2 soluble a été comparée (Reginald F Clayton et al. 2002) ainsi que le blocage de l'interaction E2-CD81 (A Owsianka et al. 2001).

Depuis plusieurs années, les HCVpp et les HCVcc sont des outils de référence pour l'étude des phénomènes de neutralisation que ce soit en système hétérologue ou homologue. Le modèle des HCVpp constitue, quant à lui, le système le plus adapté pour l'étude de la réponse autologue car il peut permettre la production de particules portant des enveloppes identifiées chez des individus infectés (D. Lavillette et al. 2005; Pestka et al. 2007; Thomas von Hahn et al. 2007; Dowd et al. 2009). De plus l'incorporation de gènes rapporteurs, comme celui de la Green Fluorescence Protein (GFP) ou de la luciférase, permet une évaluation du niveau de transduction des cellules cibles.

V.2. Les cibles des anticorps neutralisants

La neutralisation virale par des anticorps est un mécanisme de l'immunité antivirale. Elle peut se définir comme la perte de l'infectivité virale résultant de la fixation de l'Ac sur le virion. Ces anticorps appelés «anticorps neutralisants», ciblent différents étapes de l'infection : blocage de l'attachement à la cellule cible et l'interaction entre le virus et les facteurs d'entrée cellulaire (encombrement ou modification conformationnelle allostérique), inhibition de l'internalisation du virus par endocytose, interférence avec la protéine de fusion ou inhibition la décapsidation du virus et des premières étapes de la réplication virale (Figure 17).

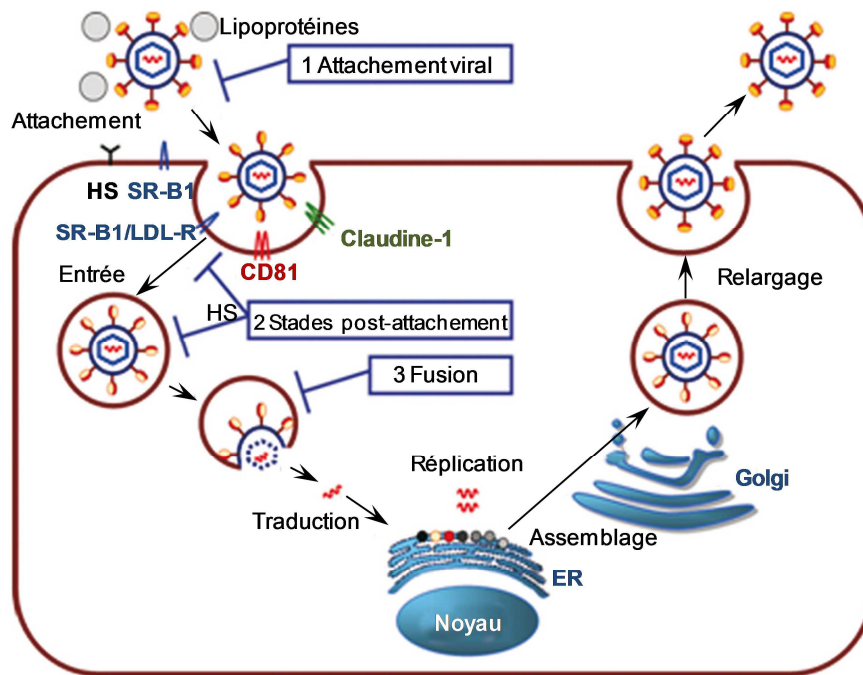


Figure 17: Représentation schématique des points d'action des anticorps neutralisants du VHC.
(D'après Zeisel et al. 2007)

En utilisant différents modèles *in vitro*, de multiples épitopes (linéaires, conformationnels et discontinus) ciblés par des anticorps neutralisants ont été identifiés dans les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.

V.2.1 Epitopes linéaires

Les deux régions de la glycoprotéine E2 les plus caractérisées contenant des épitopes linéaires sont (i) HVR-1 (aa 384-410), (ii) et une séquence d'aa adjacents (aa 413-420) de E2 (A Owsianka et al. 2001; A. Owsianka et al. 2005; Alexander W Tarr et al. 2006; Alexander W. Tarr et al. 2007). Les anticorps dirigés contre HVR1 sont détectables chez la plupart des patients infectés mais sont spécifiques de l'isolat et évoluent en permanence. Pendant la primo-infection, l'émergence de variants viraux du VHC a été associée à l'apparition d'anticorps anti-HVR1, fournissant ainsi la première preuve présomptive d'une réponse neutralisante (A J Weiner et al. 1992; Taniguchi et al. 1993; N Kato et al. 1993; P Farci & R H Purcell 2000). En revanche, peu ou pas de diversification de HVR1 a été observée chez les virus isolés parmi les patients atteints d'une hypogammaglobulinémie ou chez les chimpanzés ayant échoué à produire des anticorps anti- E2 (Booth et al. 1998; Puntoriero et al. 1998; S. E. Bassett et al. 1998; S C Ray et al. 2000; Francois Penin et al. 2001).

L'épitope adjacent comprenant les aa 412 à 423 est impliqué dans la liaison au CD81 (Figure 18). Il a tout d'abord été défini par des anticorps monoclonaux (AP33 et 3/11,) produits chez des rongeurs immunisés avec la protéine recombinante E2 (A Owsianka et al. 2001; A. Owsianka et al. 2005; Alexander W Tarr et al. 2006; Alexander W. Tarr et al. 2007). Seulement 2,5% des sérums de sujets toujours infectés par le VHC ou ayant guéri avait la capacité de reconnaître cette région d'E2 (Alexander W. Tarr et al. 2007). Cet épitope diffère de HVR-1 car il est hautement conservé parmi les différents génotypes du VHC (A. Owsianka et al. 2005; Broering et al. 2009). Dans le modèle HCVcc, des mutations de cet épitope conservé peuvent apparaître spontanément ou après sélection en présence de l'Ac monoclonal AP33 (Gal-Tanamy et al. 2008; Dhillon et al. 2010). D'autres anticorps monoclonaux neutralisants ciblant également les aa 412 à 423 ont été décrits : 95-2, HCV-1 et H77.39 (Figure 18).

Deux épitopes situés dans la glycoprotéine E2 ont été décrits comme en agissant de manière antagoniste. Le premier est situé dans une région hautement conservée (aa 412-426) alors que le deuxième est situé dans une région plus variable (aa 434-446). Les Ac induits par ce dernier empêcheraient la liaison des Ac neutralisants induits par le premier épitope (P. Zhang et al. 2007; P. Zhang et al. 2009).

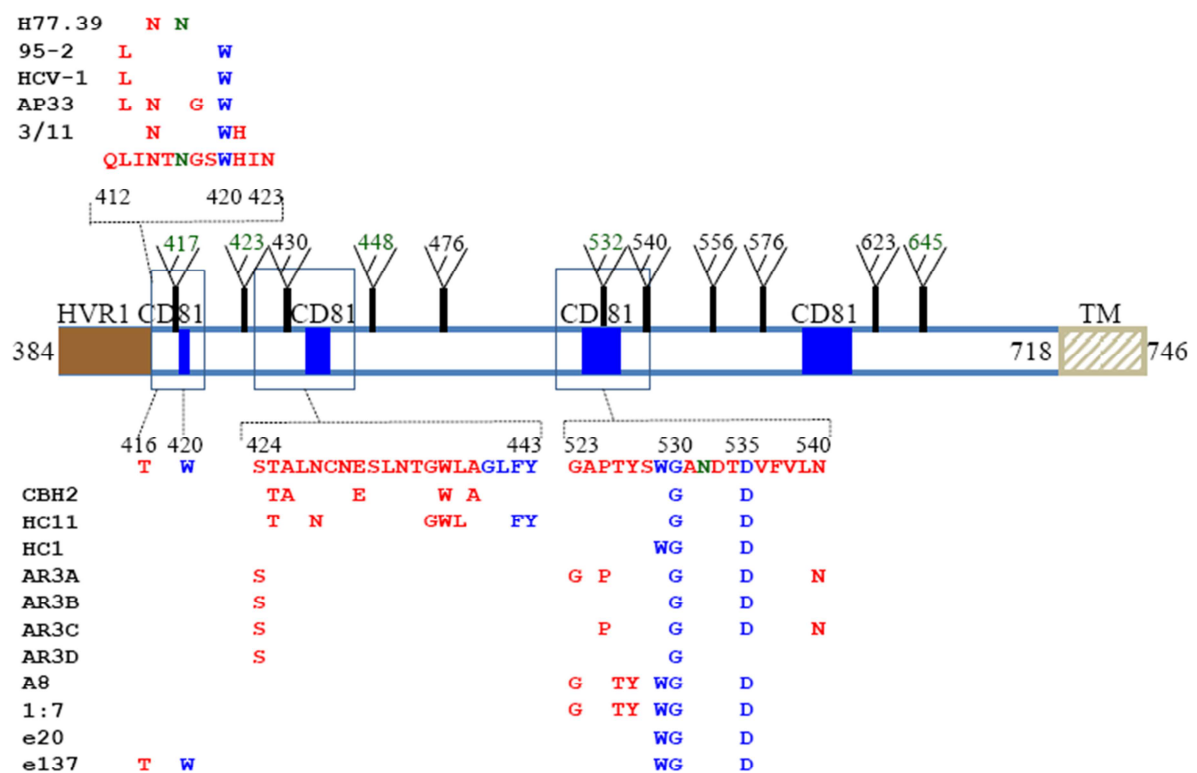
Il faut signaler que le nombre d'épitopes cibles des Ac neutralisants est beaucoup plus limité sur E1 que sur E2. Deux épitopes ont été décrits à ce jour : aa 192-202, aa 313-326. Ils sont ciblés respectivement par les Ac monoclonaux H-111 (Zhen-Yong Keck et al. 2004; Marlène Dreux et al. 2006) et IGH505/IGH526 (J.-C. Meunier, Rodney S. Russell, Goossens, et al. 2008; Haberstroh et al. 2008).

V.2.2 Epitopes conformationnels

Un certain nombre d'épitopes conformationnels ont également été identifiés dans la glycoprotéine E2 en utilisant des anticorps de patients infectés (Op De Beeck et al. 2004; Zhen-Yong Keck et al. 2004; Zhen-Yong Keck et al. 2005; Zhen-Yong Keck et al. 2007; Johansson et al. 2007; Law et al. 2008). Trois domaines conformationnels (A, B et C) situés dans E2 sont antigéniques (Figure 18). Les anticorps dirigés contre le domaine A ne sont pas neutralisants, ils cibleraient des protéines d'enveloppe isolées plutôt que des protéines intégrées dans les virions (Zhen-Yong Keck et al. 2004; Law et al. 2008). Les anticorps spécifiquement dirigés contre les domaines B et C sont neutralisants, probablement par inhibition compétitive de l'interaction CD81-E2. Ainsi, la plupart des aa nécessaires à la

liaison des anticorps au domaine B (G530, D535, W529 et Y527) (Johansson et al. 2007; Z.-y. Keck et al. 2009; Law et al. 2008; Perotti et al. 2008; A. M Owsianka et al. 2008) sont identiques aux résidus critiques pour la liaison d'E2 à CD81 (A. M. Owsianka et al. 2006; Johansson et al. 2007; Rothwangl et al. 2008). L'anticorps monoclonal AR3A, dirigé contre le domaine B, présenterait une réactivité croisée largement neutralisante vis-à-vis d'un panel de HCVpp et de HCVcc de type JFH1. Une activité protectrice de l'AR3A vis-à-vis de l'infection par le VHC a été démontrée chez des souris chimérique portant un foie humain (Alb-uPA/SCID) (Law et al. 2008). D'autres anticorps monoclonaux neutralisants ciblant également ces trois domaines ont été décrits (Figure 18).

Ac neutralisants dirigés contre des épitopes linéaires



Ac neutralisants dirigés contre des épitopes conformationnels

Figure 18: Représentation des cibles principales des Ac neutralisants sur la glycoprotéine E2

(D'après Wang et al 2011).

V.3. Anticorps neutralisants et contrôle de l'infection

Avant la découverte du VHC, des essais cliniques de thérapie avec des IgG avaient démontré la prévention d'hépatites non-A, non-B post-transfusionnelles (Knodel et al. 1976;

Sugg et al. 1985; Conrad & S M Lemon 1987; Sánchez-Quijano et al. 1988). Selon d'autres études cliniques, la transmission du VHC serait réduite entre partenaires ayant reçu des gammaglobulines de patients atteints du VHC (Piazza et al. 1997). Un inoculum infectieux obtenu au cours de l'infection aiguë chez un patient évoluant vers la chronicité peut être neutralisé après incubation *in vitro* avec du plasma du même sujet collecté pendant deux ans (P Farci et al. 1994). Des Ac anti-HVR1 permettent la protection de chimpanzés contre les variants ayant le même HVR1 (P Farci et al. 1996). Chez des chimpanzés traités avec des gammaglobulines anti-VHC, un retard dans l'apparition d'une infection aiguë après inoculation des animaux a pu être observé (K Krawczynski et al. 1996).

Dans le contexte de l'élimination virale spontanée, le rôle des anticorps neutralisants dirigés contre le VHC n'est pas complètement élucidé. Plusieurs auteurs ont montré que l'éradication n'était pas systématiquement associée à la présence d'une activité neutralisante hétérologue (C. Logvinoff et al. 2004; J. C. Meunier et al. 2005). Dans l'étude menée par Netski *et coll.*, portant sur une cohorte de 11 patients usagers de drogues infectés par des souches de génotype 1, une réponse neutralisante hétérologue contre la souche H77(génotype 1a) était détectable au bout de 6 à 8 mois chez seulement un des trois individus ayant guéri spontanément (Netski et al. 2005).

Avec le modèle HCVpp, deux travaux ont montré une relation entre le contrôle de l'infection et la présence d'une réponse neutralisante autologue précoce chez des patients infectés par une source unique (D. Lavillette et al. 2005; Pestka et al. 2007). Lavillette *et al.* ont analysé la réponse neutralisante autologue chez 17 patients contaminés dans un centre d'hémodialyse par deux souches du VHC de génotype 1b. Les Ac neutralisés produits pendant la phase précoce ont été corrélés à une diminution de la charge virale menant à la guérison spontanée. L'infection chronique a été caractérisée par l'absence d'anticorps neutralisants pendant la phase précoce de l'infection (D. Lavillette et al. 2005). Dans la deuxième étude, Pestka *et al.*, ont exploré une cohorte de 49 femmes enceintes infectées accidentellement par des immunoglobulines anti-D contaminées par une souche unique du VHC, souche AD78 de génotype 1b. Chez les femmes ayant guéri spontanément, des anticorps neutralisants ont été détectés au cours de la phase précoce puis leur taux diminuait au cours du temps, jusqu'à devenir non détectables. Par contre, à l'inverse, peu ou pas d'anticorps neutralisants étaient détectés pendant la phase précoce chez les femmes ayant évolué vers la chronicité. Au contraire, des Ac neutralisants étaient retrouvés très tardivement, c'est-à-dire 10 à 17 ans après la primo-infection (Pestka et al. 2007). L'infection chronique par

le VHC a été caractérisée par l'absence ou un titre faible d'anticorps neutralisants dans la phase précoce de l'infection. L'infection persiste malgré l'induction d'anticorps de neutralisation croisée dans la phase tardive.

Le rôle de la réponse neutralisante en cas de réinfection est également un élément clef dans la compréhension de l'histoire naturelle. Osburn *et al.* ont étudié le rôle de la réponse neutralisante hétérologue lors de la réinfection consécutive à la primoinfection. Parmi 22 patients consommateurs réguliers de drogues par voie intraveineuse, ayant guéri spontanément d'une infection par le VHC, la moitié d'entre eux ont été réinfecté durant le suivi, sept d'entre eux ont éliminé le virus. La virémie pendant la période de réinfection était significativement réduite par rapport à celle mesurée lors de la primoinfection. Des Ac neutralisant dirigés contre des HCVpp hétérologues ont été détectés pour sept de ces patients réinfectés. Par contre, peu d'Ac hétérologues ont été détectés chez les patients ayant évolué vers la chronicité (Osburn et al. 2010). La guérison après une réinfection par le VHC serait donc associée à la production d'une réponse humorale neutralisante croisée. Une étude récente menée chez le chimpanzé indique que la réponse neutralisante hétérologue serait insuffisante pour conférer une protection à long terme. La protection contre la réinfection serait due à un ensemble de réponses immunitaires innées et adaptatives (B. Barth et al. 2011).

V.3.1 Rôle dans la chronicité

La majorité des patients infectés évoluent vers une hépatite chronique, malgré la présence d'une réponse humorale dirigée contre différents épitopes viraux, en particulier ceux contre des glycoprotéines d'enveloppe (K G Hadlock et al. 2001; Netski et al. 2005; C. Logvinoff et al. 2004). Chez le chimpanzé et l'homme, le développement de la réponse neutralisante coïnciderait avec celui de la réponse humorale anti-E2 et anti-E1 (C. Logvinoff et al. 2004).

Dans les premières études fonctionnelles basés sur l'étude de la neutralisation hétérologue (modèle HCVpp), la majorité des patients ayant évolué vers la guérison développait peu ou pas d'anticorps neutralisants, alors que ceux évoluant vers la chronicité développaient ces anticorps parfois à des titres élevés mais beaucoup plus tardivement (B. Bartosch et al. 2003; Logvinoff et al. 2004; D. Steinmann et al. 2004; Netski et al. 2005; von Hahn et al. 2006; Kaplan et al. 2007; Dhillon et al. 2010)

Dans un travail explorant la réponse neutralisante autologue, Dowd *et al.* ont montré l'absence ou le faible titre d'Ac neutralisants lors de la phase aigüe chez des patients évoluant ultérieurement vers la chronicité.

Ces différentes observations interrogent sur l'existence de mécanismes d'échappement menant à l'échec de la réponse immunitaire humorale.

V.3.1.1 Échappement à la neutralisation

Les interactions des glycoprotéines du VHC avec lipoprotéines de haute densité (HDL) et le récepteur scavenger BI (SR-BI) protégeraient des anticorps neutralisants (Dreux *et al.* 2006; Bartosch *et al.* 2003). *In vitro*, elles réduisent l'effet neutralisant d'Ac dirigés contre E2 ou purifiés à partir de sérum de patients infectés vis-à-vis de VHCpp et VHCcc (Bartosch *et al.* 2005 ; Meunier *et al.* 2005; Lavillette *et al.* 2005 ; Bartosch *et al.* 2005 ; Dreux *et al.* 2006 ; Voisset *et al.* 2006 ; Vanwollegem *et al.* 2008). L'interaction HDL/SR-BI interférerait avec les Ac bloquant la liaison entre CD81 et E2 (Bankwitz *et al.* 2010).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC sont hautement N-glycosylées (Paragraphe III.2), ce qui peut moduler leur immunogénicité. Selon trois études (Helle *et al.* 2007; Falkowska *et al.* 2007; Helle *et al.* 2010). Helle *et al.* (Helle *et al.* 2007), la présence de certains glycanes (E2N1, E2N6 et E2N11) situés sur E2, réduirait la sensibilité des HCVpp à la neutralisation. Ces glycanes entravent également l'accès de CD81 à son site de liaison.

Des études récentes indiquent que le VHC peut aussi échapper à la neutralisation par une transmission directe de cellule à cellule (Timpe *et al.* 2008; Witteveldt *et al.* 2009; Brimacombe *et al.* 2011). Les protéines CLND-1 (Timpe *et al.* 2008) et Occludine (Ciesek *et al.* 2011) sont essentielles pour ce mode de transmission. Cependant, une étude récente révèle que l'ensemble des récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée virale serait nécessaire à la transmission de cellules à cellules (Brimacombe *et al.* 2011).

Zhang *et al.* ont décrit un autre mécanisme d'échappement impliquant une compétition entre Ac neutralisants et non neutralisants. Les Ac induits contre un épitope conservé de E2 (aa 412-426) empêcheraient la liaison des Ac neutralisants induits par un épitope plus variable (aa 434-446) (P. Zhang *et al.* 2007) . Ses résultats n'ont pas été corroborés par d'autres études récentes (Sautto *et al.* 2012; Tarr *et al.* 2011)

L'évolution génétique du VHC lui confère une capacité d'adaptation à l'hôte lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire. Initialement Farci *et al.* avaient corrélié l'apparition de mutations dans HVR1 et celle d'anticorps dirigés contre le VHC Farci *et al.* 2000 science. La région HVR1 a été décrite comme un « leurre immunologique » focalisant

la réponse humorale vers une cible hypervariable, protégeant ainsi d'autres épitopes neutralisants conservés (S C Ray et al. 1999). Dans des travaux ultérieurs, Von Hahn *et al.* ont montré que l'échappement à la réponse humorale serait lié à un décalage temporel entre l'évolution génétique des enveloppes E1 et E2 et la production des anticorps neutralisants correspondants. Chez le patient H77, infecté chroniquement par une souche de génotype 1a, il a été noté un échappement continu à la réponse neutralisante autologue lié à des mutations entraînant des pertes de reconnaissance des gp d'enveloppe par les anticorps (Thomas von Hahn et al. 2007). Bien que capable de neutraliser les quasi-espèces circulant antérieurement, les anticorps sériques n'ont pas réussi à neutraliser les variants dominants contemporains. Ces observations ont été confirmées par un autre travail réalisé sur 3 patients chroniques (Dowd et al. 2009).

L'identification de résidus présents sur des souches résistantes à la neutralisation est un élément primordial dans la compréhension des mécanismes d'échappement (Gal-Tanamy et al. 2008), (Z.-y. Keck et al. 2009), (Z.-Y. Keck et al. 2011).

Tableau 8: Récapitulatif de mutations impliquées dans l'échappement à la neutralisation

Enveloppe	Anticorps	Modèle d'étude	Mutation(s) par rapport à la souche initiale	Fonction compromise	Références
JFH1, gt 2a	CBH-2	HCVcc	D413G ou A439E L438F ¹ ou	Perte du fitness	(Z.-Y. Keck et al. 2011)
JFH1, gt 2a	HC-11	HCVcc	L438F+N434D L438F+T435A	Perte du fitness	(Z.-Y. Keck et al. 2011)
HJ3-5, gt 1a	AP33	HCVcc	N415Y ² +E655G	Entrée déficiente	(Gal-Tanamy et al. 2008)

¹:L438F en HCVpp → l'efficacité de liaison avec CD81 est réduite de moitié

²:N415Y en HCVpp → pas de réduction de liaison avec CD81

V.3.2 Rôle dans la réinfection du greffon

L'infection par le VHC est souvent détectée plusieurs années après la transmission, évoluant silencieusement vers une cirrhose ou un cancer du foie. Aux stades les plus évolués, la transplantation hépatique s'avère nécessaire. La réinfection du greffon hépatique se produit très rapidement après la transplantation avec une augmentation rapide de l'ARN du VHC. La progression histologique est accélérée : 30% des patients développent une cirrhose cinq ans

après la transplantation (Watt et al. 2010). A ce jour, il n'y a pas une stratégie prophylactique pour prévenir la réinfection du greffon. L'échappement aux anticorps neutralisants serait un des déterminants clés de la réinfection du greffon au cours de la transplantation hépatique. Une étude récente basée sur le suivi de six patients infectés par le VHC et admis pour une transplantation hépatique, montre que la composition de la population virale change très rapidement après la greffe. Seule une petite fraction de variants viraux circulant dans le sang réinfecte le greffon. Des mutations adaptatives situées dans HVR1 et dans le domaine de fixation au CD81 apparaissent chez les variants émergents après transplantation. Ces virus sont résistants à la réponse neutralisante autologue (Fafi-Kremer et al. 2010). Fofana *et al.* ont démontré que les mutations F₄₄₇L, S₄₅₈G and R₄₇₈C conféraient une meilleure capacité d'entrée de ces variants dans les cellules cibles et une capacité d'échappement à la réponse neutralisante (Fofana et al. 2012.).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans ce travail, nous souhaitons contribuer à la compréhension du rôle de la réponse humorale neutralisante dans l'histoire naturelle de l'infection par le VHC. Seule l'étude de la réponse autologue peut nous aider à appréhender les mécanismes conduisant à la guérison précoce ou à l'échappement immunitaire (Dowd Pestka et Lavillette Von han). L'absence de réponse autologue sur les variants contemporains plasmatiques est-elle un élément explicatif de l'échappement du VHC à la réponse humorale ? La réponse neutralisante autologue joue-t-elle ou non un rôle déterminant dans l'éradication du VHC pendant les phases précoces de l'infection ? Cette approche est possible compte tenu du matériel biologique disponible pour réaliser ce travail. Il s'agit des sérums séquentiels issus de deux patients ayant guéri spontanément et ayant bénéficié d'un suivi après une élimination virale rapide (Paragraphe VI).

L'objectif de ce travail était :

- d'examiner la diversité et l'évolution précoce des cibles principales des anticorps neutralisants (les glycoprotéines d'enveloppe E1E2) en cas de guérison spontanée rapide,
- d'analyser comparativement l'infectivité des différents variants du VHC présents aux stades précoces de l'infection,
- d'explorer la capacité neutralisante des anticorps des patients étudiés vis-à-vis des variants majoritaires et de plusieurs variants minoritaires portant un profil mutationnel particulier.

PATIENTS, MATERIELS ET METHODES

VI. Sélection et présentation des patients étudiés

Le service de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Bretonneau du CHRU de Tours dispose d'une importante sérothèque constituée au cours de l'activité diagnostique et parfaitement caractérisée pour les marqueurs viraux sérologiques et moléculaires. Des prélèvements sériques séquentiels de patients suivis après une primo-infection par le VHC ont été conservés (*recueil des données réalisé par le Dr F. Dubois, praticien hospitalier dans le service de Bactériologie-Virologie, CHU de Tours*). L'évolution clinique et biologique de ces patients est connue, certains ayant évolué vers une guérison. Ces prélèvements séquentiels sont très bien caractérisés sur le plan biochimique et virologique et correspondant à des cas d'hépatites C diagnostiquées au début de l'infection. Pour cette étude, nous avons sélectionnés 2 cas d'infection par le VHC ayant évolué vers la guérison sans traitement.

- suivi sur 38 mois pour le patient 1, infecté par une souche de génotype 1b (Tableau 9).

- suivi sur 13 mois le patient 2, infecté par une souche de génotype 3 (Tableau 9).

Pour ces 2 cas, nous disposons de sérums dits « précoces », contemporains du pic de l'ALAT accompagnant l'épisode de primo-infection. Ces deux patients ont donné leur accord pour l'utilisation scientifique de leurs prélèvements.

Tableau 9 : Caractéristiques biochimiques et virologiques des patients P1 et P2

Denomination du sérum	ALAT ^a (IU/L)	Temps écoulé depuis le pic d'ALAT	Ac anti-VHC				ARN VHC PCR ^d	Genotype ^e	
			EIA ^b	Immunoblot ^c					
				anti-core	anti-NS3	anti-NS4			anti-NS5
ND		5 m avant	-						
P1t0 (ND)	1998	/							
P1t1	625	10 j	>4	-	+++	++	-	+	1b
P1t2	1076	17 j		-	++++	+++	++	+	
P1t3	53	54 j		-	++++	++++	++	-	
P1t4	32	3 m		-	++++	++++	++	-	
P1t5	68	10 m		-	++++	+++	-	-	
P1t6	116	30 m		-	+++	++	-	-	
P1t7	67	38 m		-	+++	++	-	-	
ND		22 m avant	-						
P1t0 (ND)	1089	/	+						
P2t1	1699	4 j		++	+	-	-	+	3
P2t2	162	21 j		+	++	-	-		
P2t3	67	2 m		++++	++++	+++	-	+	
P2t4	65	3 m		++++	++++	++++	-	-	
P2t5	23	5 m		ND	ND	ND	ND	ND	
P2t6	11	6 m		++++	++++	+++	-	-	
P2t7	ND	11 m		++++	++++	-	-	-	
P2t8	24	13 m		++++	++++	-	-	-	

ND : non disponible, m : mois, j : jours ; ^a L'activité sérique de l'ALAT est considérée comme normale en dessous de 35 UI/L. ^b ELISA. ^c Réactivités anticorps notées de "-" à "++++" selon les recommandations du fabricant de la trousse Chiron RIBA HCV 3.0. ^d Détection qualitative de l'ARN du VHC (Amplicor HCV detection kit 2,0 Roche) ^e Versant HCV genotype assay (LiPA), Bayer

VI.1. Présentation du cas du patient 1 (P1)

Une séroconversion anti-VHC a été observée entre Janvier 2001 et Août 2002. De plus, une élévation majeure de l'activité des transaminases a été notée entre le 23/07/2002 et le 09/08/2002. L'intensification du profil immunoblot sur les prélèvements P1t1, P1t2 et P1t3 confirme qu'il s'agit d'une infection récente par le VHC. L'ARN du VHC a pu être détecté dans les prélèvements P1t1 et P1t2, contemporains de la primo-infection (dits « précoces »). Puis, très rapidement, la virémie VHC s'est avérée négative (prélèvement E).

VI.2. Présentation du cas du patient 2 (P2)

Une élévation majeure de l'activité des transaminases a été notée sur le prélèvement P2t1 (la normalisation de la valeur des l'ALAT étant observée par la suite). De plus, l'intensification du profil immunoblot sur les prélèvements P2t1, P2t2, P2t3, P2t4 confirme qu'il s'agit d'une infection récente par le VHC. L'ARN du VHC a pu être détecté dans les prélèvements P2t1, P2t2 et P2t3, contemporains de la primo-infection (dits « précoces »). Puis, très rapidement, la virémie VHC s'est avérée négative (prélèvement P2t4).

VII. Sélection de sérums témoins

Les sérums mentionnés au paragraphe ci-dessous ont été utilisés comme témoins pour réaliser les expériences de neutralisation (cf paragraphe XVII).

VII.1. Sérums de donneurs de sang

Une convention a été signée avec l'Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique (Site de Tours) pour l'obtention de 100 sérums issus de donneurs de sang testés négatifs pour la PCR les marqueurs viraux suivants (Ac anti-VHC, Ac anti-VIH-1 et 2, Ac anti-HBc, AgHBs, Ac anti-HTLV1 et 2, ARN du VHC, ARN du VIH et ARN du VHB). Un mélange à proportion égale de ces 100 échantillons (nommé CN) est réalisé pour servir de témoin négatif dans les expériences de neutralisation (paragraphe XVIII). Des aliquotes de 1 mL sont conservées à -20°C.

VII.2. Sérums de patients avec une activité anticorps dirigée contre la région HVR1

Nous avons sélectionné quatre sérums provenant des patients porteurs chroniques du VHC, vus en consultation dans le service de Gastroentérologie du CHRU de Tours. Ces sérums présentaient une activité anti-HVR1 positive, selon les résultats d'un immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics) réalisés au cours du suivi. Le mélange de ces trois sérums a été nommé HVR1+. Des aliquotes de 1 mL sont conservées à -20°C (Tableau 10).

Tableau 10 : Résultats virologiques des sérums témoins HVR1+

Dénomination sérum	Anti-VHC					Genotype ^b	CV VHC ^c
	Immunoblot ^a						
	anti-E2	anti-core	anti-NS3	anti-NS4	anti-NS5		
S1	+++	++	+++	+++	-	NT	ND
S2	++++	++	++++	++++	-	1a	4,98
S3	++++	++	++++	++++	+++	1a	1,9
S4	++++	++++	++++	++++	-	3	6,5

a) Réactivités anticorps notées de "-" à "++++" selon les recommandations du fabricant de la trousse INNO-LIA HCV Score ; b) Génotype déterminé avec le kit Versant HCV genotype assay (LiPA), Bayer ; c) Charge virale (cv) mesurée avec le kit Bayer Versant HCV RNA 3.0 Assay

Trois autres sérums issus des patients infectés chroniquement par une souche de génotype 3 ont été sélectionnés. Ils présentaient également une activité Ac dirigée contre la région HVR1, selon l'immunoblot INNO-LIA HCV Score, Innogenetics. Après mélange des ces trois sérums, les Immunoglobulines G (IgG) ont été purifiés avec le kit MabTrapTM (GE Healthcare) selon les recommandations du fabricant. Le mélange de ces trois sérums a été nommé IgG3. Des aliquotes de 1 mL sont conservées à -20°C. La mesure de la concentration d'IgG a été faite avec BB ProSpec à partir de 100µL de la dilution finale.

MATERIEL

VIII. Plasmides et vecteurs utilisés pour le clonage des gènes d'intérêt

VIII.1. Vecteur navette (pGEM®T Easy Vector, Promega)

Ce vecteur est un système convenant pour cloner des produits issus d'une réaction de PCR (Figure 19). La coupure de ce vecteur par EcoRV et l'addition en 3' terminal d'une thymidine améliore l'efficacité de la ligation des produits PCR pour empêcher ainsi recircularisation du vecteur. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et également les promoteurs de la polymérase ARN T7 et SP6 qui flanquent une région de clonage multiple. Cette dernière contient un α -peptide codant pour l'enzyme β -galactosidase. Ceci permet une sélection par couleur des colonies basée sur la rupture du cadre de lecture du gène de fusion *LacZ* lorsque l'insert est présent (colonies blanches).

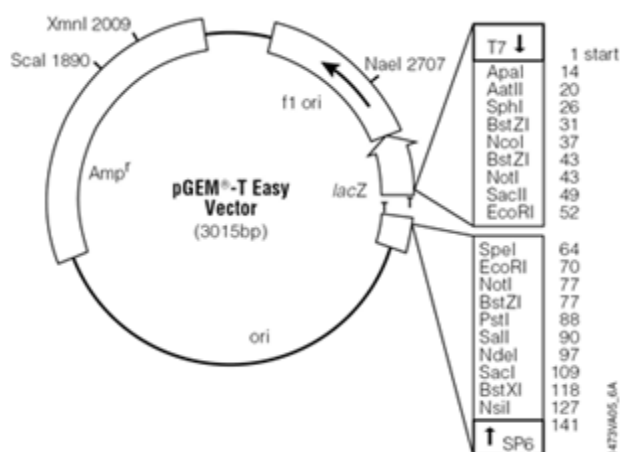


Figure 19: Représentation schématique du vecteur de clonage pGEM®T Easy Vector, Promega

VIII.2. Vecteurs d'expression

VIII.2.1 pcDNA 3.1(+), Invitrogen

Ce vecteur permet de cloner les gènes d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur du cytomégalovirus humain (CMV) et du promoteur T7 (Figure 20). Le promoteur CMV permet une expression efficace et à niveau élevée de la protéine recombinante dans les cellules eucaryotes (Andersson *et al.* 1989, Boshart *et al.* 1985).

Le promoteur T7 permet la transcription *in vitro* et le séquençage. Ce vecteur possède un signal terminateur de la transcription : SV40 poly A.

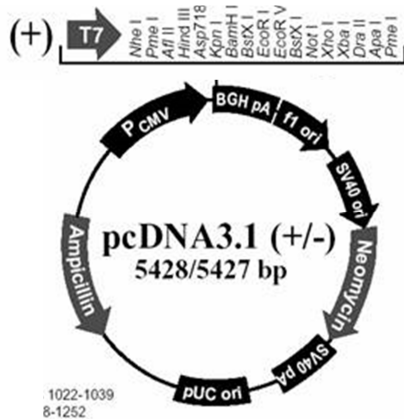


Figure 20: Représentation schématique du vecteur d'expression pcDNA 3.1(+), Invitrogen

VIII.3. Autres vecteurs d'expression

VIII.3.1 pTM1_{E1/E2}

Il s'agit d'un vecteur dans lequel est inséré un clone d'enveloppe de génotype 1a comportant les 60 premiers résidus de la protéine de la capsidie et la totalité des gènes E1 et E2 (numéro d'accession AF529293, 2239 pb, fourni par le Dr J. Dubuisson, Institut Pasteur de Lille).

VIII.3.2 pTGLuc

Il s'agit d'un vecteur rétroviral déficient de 7267pb, portant un gène marqueur (gène codant pour l'enzyme de la luciférase) et le signal d'encapsidation Ψ . Il a été fourni gracieusement par le Dr J. Dubuisson, Institut Pasteur de Lille.

VIII.3.3 pMN_{gag-pol}

Ce vecteur code pour les protéines de la nucléocapsidie d'un rétrovirus (MLV), obtenu auprès du Généthon par le Pr JC Pagès, INSERM U966, Tours (Figure 21).

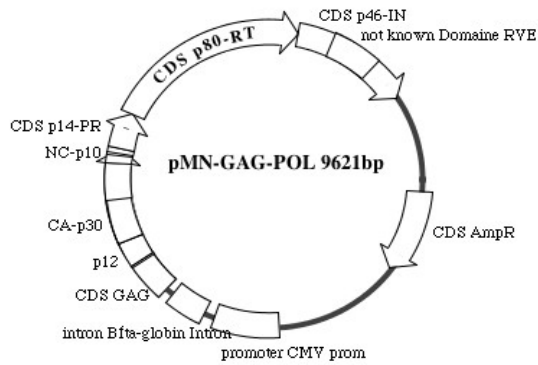


Figure 21: Représentation schématique du vecteur pMN_{gag-pol}

VIII.3.4 pCMV-Ampho

Ce vecteur rétroviral (Figure 21) code pour l'enveloppe murine amphotrope du MLV (souche MLV_{4070A}, numéro accession U36991.1), 2890pb. Cette enveloppe portée à la surface d'un virus ou rétrovirus pseudotypé confère la capacité d'entrer dans toutes les cellules de mammifères (excepté les cellules de hamster et les cellules bovines).

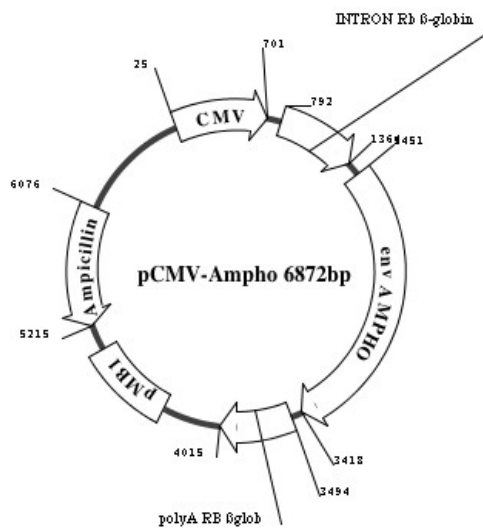


Figure 22: Représentation schématique du vecteur pCMV-Ampho

IX. Lignées cellulaires

IX.1. Lignée 293-T

Les cellules 293T ou HEK293-T [Réf. ATCC CRL-11268, (F. L. Graham et al. 1977)] proviennent d'une lignée cellulaire humaine provenant de rein embryonnaire. Elles ont été immortalisées avec le grand antigène T du SV40 qui rend possible la réplication des plasmides transfectés contenant l'origine de réplication du SV40. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM complété avec 10% de SVF, 2mM de Glutamax et 100 U/mL de Pénicilline et 100 µg / mL de Streptomycine. La transfection de ces cellules avec des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux permet la production de pseudoparticules rétrovirales ou lentivirales.

IX.2. Lignée Huh-7

Cette lignée cellulaire humaine, dérivée d'un hépatocarcinome (Nakabayashi et al. 1982), a été fournie gracieusement par le Dr J. Dubuisson, Institut Pasteur de Lille. Les cellules Huh-7 sont cultivées dans du milieu « Dulbecco's modified minimal essential medium » (DMEM, Gibco) complété avec 10% sérum de veau foetal (SVF), 2mM de Glutamax, (L-Alanyl-L-Glutamine, Gibco) et 100U/mL de Pénicilline et 100µg / mL de Streptomycine. La densité optimale d'ensemencement est de 5×10^5 cellules par flacon de 75 cm².

X. Anticorps utilisés

X.1. Anticorps primaires

La sélection des différents anticorps monoclonaux a été réalisée l'aide du site : <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-index> , option «HCV immunology database » en fonction de l'épitope ciblé. Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce travail sont décrits dans le Tableau 11.

Tableau 11: Descriptif des anticorps monoclonaux utilisés

Nom	Spécificité	Origine	Séquence de l'épitope (localisation selon H77)	Application (dilution)	Référence bibliographique
H111 ^{a)}	E1 _{VHC}	human	YEVARNVSGVYH (E1 :197-207)	Western-Blot (1:1000)	Keck <i>et al.</i> , 2004
A4 ^{b)}	E1 _{VHC}	souris	SSGLYHVTNDC (E1 :197-207)	WesternBlot (1:1000)	Dubuisson <i>et al.</i> , 1994
H52 ^{c)}	E2 _{VHC}	souris	GSWHINSTALNCNE (E2 : 418-431)	WesternBlot (1:1000)	Deleersnyder <i>et al.</i> , 1997
AP33 ^{d)}	E2 _{VHC}	souris	QLINTNGSWHVN (E2 : 412-423)	WesternBlot (1:1000)	Owsianka <i>et al.</i> , 2005
Anti-C _{MLV} ^{e)}	Capside _{MLV}	chèvre		WesternBlot (1:5000)	Piver <i>et al.</i> , 2006
Anti Actine ^{f)}	β -Actine	souris			

a) Fourni gracieusement par le Dr S. Fount (Stanford Medical School Blood Center, Palo Alto)

b) Fourni gracieusement par le Dr Harry Greenberg (Université de Stanford, Californie, E)

c) Fourni gracieusement par le Dr J.L Dubuisson (Institut Pasteur, Lille)

d) Fourni par Genentech (San Francisco)

e) Fourni gracieusement par le Dr. J.L. Darlix (Ecole Normale Supérieure, Lyon)

f) Ac anti-actine Sigma

X.2. Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires utilisés dans ce travail sont décrits dans le Tableau 12.

Tableau 12: Descriptif des anticorps secondaires utilisés, couplés à la peroxydase.

Dénomination	Origine	Application (dilution)	Fournisseur	Référence fournisseur
HRP Anti-mouse IgG	lapin	WB (1/10000)	Sigma	A9044
HRP Anti-human	chèvre	WB (1/10000)	Biosource	AHI1304
HRP Anti-chèvre	lapin	WB (1/10000)	Jackson Immuno Research	305036045
HRP F	chèvre	WB (1/10000)	Biosource	AR14404

WB: western blot

METHODES

XI. Vérification des plasmides utilisés

XI.1. PCDNA3.1+

Une digestion enzymatique a été réalisée à partir de 500ng du plasmide avec 10 UI de l'enzyme NcoI. 3 fragments sont attendus : 3342 pb, 1351pb et 735pb.

XI.2. pTM1_{E1/E2}

Une digestion enzymatique a été réalisée à partir de 500ng du plasmide (7550 pb) avec 20 UI de l'enzyme EcoRI pendant 1h à 37°C. Deux fragments sont attendus : 2205pb et 5345pb.

XI.3. pMN_{gag-pol}

Une digestion enzymatique a été réalisée à partir de 400ng du plasmide (9621pb) avec 20 UI d'enzyme. Deux digestions avec des enzymes différentes sont réalisées :

-EcoRI durant 1h à 37°C: 3 fragments attendus : 1453pb, 6676pb et 7463pb.

-XbaI durant 1h à 37°C: 3 fragments attendus : 6163pb, 6604pb et 7459pb.

XI.4. pCMV-Ampho

Deux digestions multiples ont été réalisées à partir de 500ng de plasmide (6872pb) avec les enzymes suivantes à 20 UI chaque une:

-EcoRI + BglII durant 1h à 37°C. Deux fragments sont attendus : 1533pb et l'autre à 5339pb.

-XbaI + BamHI +Eco RI durant 1h à 37°C. Trois fragments sont attendus : 2033pb, 594pb et 4245pb.

XI.5. pTGLuc

Une PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques du gène de la luciférase (Tableau 19).

XII. Amplification des gènes E1 et E2 du VHC

XII.1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction de l'ARN du VHC a été réalisée pour chaque patient infecté à partir de 150 µL de sérum préalablement décongelé, en suivant le protocole de la trousse Nucleo Spin RNA Virus[®] (Macherey-Nagel). Le principe de l'extraction est basé sur la fixation de l'ARN sur la membrane en gel de silice dans des colonnes de centrifugation. Le virus est lysé dans un tampon dénaturant. L'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs avant l'ajout d'éthanol à 70 % qui permet d'obtenir des conditions de fixation optimales de l'ARN sur la membrane des colonnes. Puis, les ARNs fixés sur les membranes sont lavés avec différents tampons riches en éthanol absolu. Finalement, l'ARN est élu de la membrane par de l'eau exempte de RNAses, aliquoté et immédiatement conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

XII.2. Réaction de Transcription inverse

La transcription inverse a pour but de transcrire l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc) plus stable pour les réactions d'amplification. Dans ce travail, nous utilisons comme enzyme la transcriptase inverse nommée « RT Superscript II » (Invitrogen). La réaction de transcription inverse sera réalisée avec la méthode des « random hexamères » qui permet une augmentation de la sensibilité de l'étape de rétrotranscription avec le kit Superscript[®] First Strand Synthetis System for RT-PCR (Invitrogen).

XII.3. Amplification génique

L'ADNc obtenu après rétrotranscription est utilisé comme matrice pour réaliser une réaction d'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) avec un couple d'amorces externes. L'étape suivante (PCR nichée) consiste à amplifier le produit issu de la PCR précédente à l'aide d'un second couple d'amorces, s'hybridant à une partie interne de la séquence amplifiée, précédé d'une portion du gène de la capsid. L'amplification par PCR simple et nichée a été réalisée dans un volume réactionnel de 60 µL contenant 10 µL d'ADNc issu de la RT-PCR, 10 pmoles de chacune des amorces et de 45 µL du mélange Platinum PCR SuperMix High Fidelity[®] (Invitrogen), une polymérase à activité correctrice. Un témoin

négatif, réalisé en remplaçant l'ADN matrice par de l'eau ultra-pure stérile, a été systématiquement inclu dans chaque série.

XII.3.1 Cas du patient 1 (P1, souche de gt 1b)

Les amorces ont été définies à l'aide d'alignements de séquences du génotype 1b disponibles sur le site Internet suivant :

<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html> , options «Alignements» et «primalign». Les caractéristiques de ces amorces ont été analysées en utilisant le logiciel Oligo® 6 (Molecular Virology Insights).

La PCR nichée a été réalisée dans la région carboxy-terminale du gène codant la protéine de capsid VHC avec les couples d'amorces présentés dans le Tableau 13. La taille du fragment attendu est de 2036 paires de bases (pb) codant pour les acides aminés 131 à 809 selon la numérotation de la souche H77 (Figure 23).

Tableau 13: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes E1et E2 par PCR nichée (cas P1)

Amorces	Séquences nucléotidiques	T _m	Positions en nucléotides	
			selon HCV-J	selon H77
Externes				
Sens :	5' CGCAACCTCGTGGAAGGAAGGCGACA 3'	66	521-546	508 - 529
Anti-sens : Env1bExtAS	5' CGCACGTGAGGAGGATGATGGC 3'	63	2943-2964	2976 - 2955
Internes				
Sens : Env1bIntS	5' GACCTCATGGGGTACATTCCGC 3'	59	723-744	735 - 756
Anti-sens : Env1bIntAS	5' CTCACGATGCAGCCATCTCCCGGTCC 3'	71	2759-2784	2796 - 2771

Les conditions utilisées pour l'amplification sont détaillées ci-dessous :

- 1) **Première PCR** : 5 min. à 94°C et 40 cycles (20 s à 94°C, 50 s à 60°C, 2 min 30 s à 68°C, 15 min. à 68°C)
- 2) **Deuxième PCR** : 5 min. à 94°C et 35 cycles (20 s à 94°C, 20 s à 57°C, 2 min à 68°C, 15 min. à 68°C)

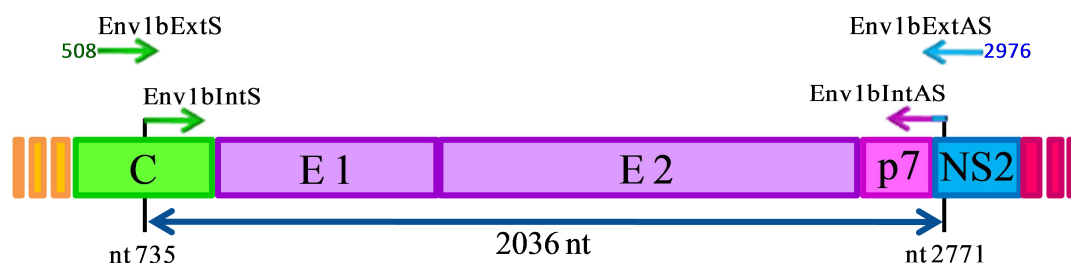


Figure 23: Représentation schématique de la région du génome du VHC amplifié à partir du sérum P1t2.

Les numérotations en nucléotides sont indiquées en prenant comme référence la souche H77 (EMBL : AF011753)

XII.3.2 Cas du patient 2 (P2, souche de gt 3a)

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'enveloppe du VHC infectant le patient n° 2 sont issues de la littérature (Brown *et al.* 2005) Tableau 14). Elles permettent l'amplification de l'intégralité des gènes E1 et E2 (y compris la séquence signal située dans le gène de la capside). La taille du fragment attendu est de 1747 paires de bases (pb) codant pour les acides aminés 170 à 746 selon la numérotation de la souche H77 (AF009606) (Figure 24).

Tableau 14: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes E1E2 par PCR nichée (cas P2)

Amorces	Séquences nucléotidiques	Tm	Positions en nucléotides selon la souche H
Externes			
Sens (C) : BrExt S-E1OS	5' ggacggggtaaactatgcaacagg 3'	54	818-841
Anti-sens (p7) : BrExt S-E1OS	5' cagcagcgacggcggttcagcg 3'	57	2619-2639
Internes			
Sens (C) : BrInt S-170	5' atgggttctctttttctatc 3'	43	852-869
Anti-sens (p7-E2) : BrIntAS-7746	5' ttatgcttctgcttggatgata 3'	41	2582-2599

Les conditions utilisées pour l'amplification sont détaillées ci-dessous :

- 1) **Première PCR** : 5 min. à 94°C et 40 cycles (20 s. à 94°C, 50 s. à 55°C, 2 min à 68°C, 15 min. à 68°C)
- 2) **Deuxième PCR** : 5 min. à 94°C et 30 cycles (20 s. à 94°C, 20 s. à 45°C, 1 min 50 s à 68°C, 15 min. à 68°C)

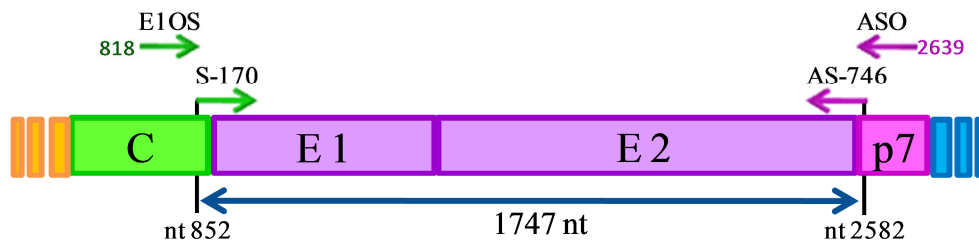


Figure 24: Représentation schématique de la région du génome du VHC amplifié à partir du sérum P2t1 et P2t2.

Les numérotations en nucléotides sont indiquées en prenant comme référence la souche H77.

XII.4. Analyse des produits issus de l'amplification génique

Les produits issus de la PCR nichée sont alors séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % dans du TAE 1X (Euromedex) contenant 0.5µg/mL de Bromure d'Ethidium (Euromedex), sous une tension de 90 V pendant 40 min. Les gels sont ensuite exposés sur une plaque à UV.

Les bandes d'agarose contenant le fragment d'ADN correspondant à ~ 2000 pb ont été découpés à l'aide d'un scalpel et purifiées avec le kit de purification Nucleo Spin® Extract II (Macherey-Nagel) en suivant les instructions recommandés par le fournisseur.

XII.5. Clonage de l'ADN amplifié dans un vecteur plasmidique

Dix μL du produit PCR purifié ont été polyadénylés avec 0.5 μL d'ATP (Invitrogen), 1.5 μL de tampon de la Taq-polymérase et 0.5 μL de Taq Polymérase (Biolabs) pendant 15 minutes à 72°C. Les produits issus de l'amplification ont été clonés dans le vecteur PGEMT Easy (Promega) selon le protocole proposé par le fournisseur.

XII.5.1 Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries *Escherichia coli* DH5a sont étalées sur une plaque de gélose nutritive Luria Bertreni(LB)-Agar sans antibiotique et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie estensemencée dans 2*12 mL du milieu. Après une nuit à 37°C sous agitation, la culture est diluée dans 500 ml de milieu LB. La densité optique à 600 nm est mesurée régulièrement jusqu'à atteindre une valeur proche à 0,5. La culture est alors refroidie sur de la glace (10 min) puis centrifugée pendant 10 min à 4369 g à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu délicatement dans 200mL de tampon TFB1 froid et filtré (AcK 30mM, MnCl₂ 2 H₂O 50mM, RbCl 100mM, CaCl₂ 10mM, glycérol 15% (v/v)) et l'incuber 5 minutes dans la glace. La suspension est centrifugée pendant 10 min à 4369g. Le culot est ensuite repris dans 200ml de tampon TFB II filtré et froid (PIPES 10mM à pH 6.5, RbCl 10mM, CaCl₂ 75mM, glycérol 15% (v/v)) et les bactéries compétentes sont aliquotées à raison de 200 μl par microtube. Les microtubes sont ensuite plongés dans un mélange carboglace/éthanol jusqu'à congélation de la suspension bactérienne et sont conservés à -80°C. Cent microlitres de bactéries compétentes sont utilisés par transformation.

XII.5.2 Transformation de bactéries compétentes

Le produit de ligation est incubé 30 minutes dans la glace (ou 4°C) en présence de 100 μL de suspension de *E. coli* DH5a rendues compétentes par une technique en utilisant de Chlorure de rubidium. La transformation s'effectue par choc thermique en plaçant la suspension dans un bain marie à 42°C durant 1 minute et 30 secondes puis deux minutes dans la glace. Les bactéries déjà transformées sont mises en culture dans 250 μL du milieu SOC

(Bio Basic Inc. Biotechnology) durant 1 heure. La suspension bactérienne est étalée sur une gélose LB-Agar (Sigma) avec de l'ampicilline (100µg/mL), après dépôt préalable de 20µL de de X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3indol-b-D-galactopyranoside, Euromedex) à 40µg /L.

XII.5.3 Sélection des clones recombinants

XII.5.3.1 PCR sur colonies de bactéries

Après 16 h d'incubation à 37°C, environ 60 colonies blanches sont repiquées sur une boîte de gélose LB-Agar-Ampicilline et conservées pendant 16h à 37°. Une autre fraction de chacune de ces 60 colonies est ajoutée à 20 µL de milieu réactionnel contenant 1 unité d'enzyme Taq-Polymerase (Biolabs), 0.5µM d'amorce sens et anti-sens dans l'insert, 4mM de dNTP). Durant les premières étapes de dénaturation (5 min. à 94°), les cellules sont lysées et leur ADN est libéré dans le milieu réactionnel. L'ADN ainsi libéré peut alors servir de matrice pour continuer 30 cycles de 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 50°C, 30sec. à 72°C, puis 5 min à 72°C. Les amorces utilisées sont les amorces universelles M13, déjà décrites dans le Tableau 15.

Chaque colonie blanche estensemencée dans 5mL de milieu liquide LB (Sigma) contenant de l'ampicilline à 50µg/mL et mise sous agitation. Après 16 h d'incubation à 37°C, 3 mL de la suspension bactérienne saturée sont centrifugées pendant 45 sec. à 10000g. L'extraction de l'ADN plasmidique à été réalisée par la méthode de lyse alcaline avec le kit NucleoSpin® Plasmid (Marcherey-Nagel) en suivant le protocole proposé par le fournisseur.

XII.5.3.2 Digestion enzymatique

Le contrôle de la présence de l'insert est réalisé après coupure du vecteur potentiellement recombinant par l'enzyme *EcoRI* (1h à 37°C). Un témoin négatif de la digestion est réalisé en parallèle avec de l'eau. Au final, (entre 40 et 50) vecteurs recombinants seront sélectionnés pour chaque prélèvement étudié. Les produits digérés sont alors séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 %. . Le profil de digestion du vecteur devra présenter une bande d'environ 2000 paires de bases correspondant à l'enveloppe et une autre de 3000 pb correspondant au vecteur de clonage vide. Tous les clones présentant l'insertion attendue ont été séquencés.

XIII. Séquençage des gènes E1/E2

XIII.1. Séquençage et analyse de séquences nucléotidiques

Chaque clone de glycoprotéines d'enveloppe du VHC (E1/E2) obtenu est séquençé par la technique décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). La réaction de séquençage est effectuée avec le kit BigDye[®] Terminator Mix v.3.1. (Applied-Biosystem[®]) sous un volume réactionnel de 10 µL contenant 2 µL de BigDye[®] Terminator v.3.1 comprenant dNTPs, les ddNTPs et l'AmpliTaq DNA Polymérase, 5 µM de l'amorce et 500 ng d'ADN plasmidique. Les amorces utilisées pour le séquençage sont décrites dans le Tableau 15.

La réaction de séquençage consiste en une dénaturation de 10 secondes à 94°C, une hybridation des amorces de 10 secondes à 50°C et une élongation de 4 minutes à 60°C durant 30 cycles. Les produits séquençés sont ensuite purifiés à l'isopropanol et mis en suspension dans une solution dénaturante de formamide. Les échantillons purifiés sont soumis à une électrophorèse de 2 heures 30 minutes sous une tension de 12200 volts à 50°C dans un séquenceur capillaire (ABI Prism[®] 3100-Avant Genetic Analyser, Applied-Biosystem[®]).

L'analyse des séquences nucléotidiques obtenues par le logiciel du séquenceur est réalisée à l'aide du logiciel Sequencing Analysis, Applied-Biosystem[®], version 5.3.1.

L'assemblage et l'alignement des séquences est effectué avec le logiciel Bioedit[©] disponible en ligne sur le site <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> en utilisant l'option ClustalW (Thompson *et coll.* *Nucleic Acids Res* 1994). Puis les séquences nucléotidiques sont traduites en séquences protéiques. Pour chaque produit d'amplification cloné, les variants les plus représentatifs de la « quasi-espèce » ont été sélectionnés et sous-clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+ (Invitrogen), (Paragraphe VIII.2.1.).

Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage des gènes E1/E2

Amorces	Séquences nucléotidiques	Tm	Positions en nucléotides	
			sur pGEMT	selon H77
<i>PLASMIDE pGEMT</i>				
Sens : M13 Forward	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	79	2949-2972	
Antisens : M13 Reverse	5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'	69,4	176-197	
<u>Amorces spécifiques du génotype 1b</u>				
REGION HVRI, E2				
Externes				
Sens : HVR1 01	5' CGCATGGCGTGGGACATGATG 3'	64		1290-1310
Anti-sens : HVR1 02	5' GGTGGAGGGAGTCATTGCAGTT 3'	60		1623-1644
Internes				
Sens : HVR1 03	5' GCTTGGGATATGATGATGAACTGGTC 3'	59		1296-1321
Antisens : HVR1 04	5' TGCCACCTGCCATTGGTGT 3'	62		1584-1603
REGION PePHD, E2				
Externes				
Sens : PePHD 01	5' GGGCCCTGGTTGACACC 3'	58		2139-2155
Anti-sens : PePHD 02	5' CAGACGCGCGCTCCGC 3'	62		2521 - 2537
Internes				
Sens : PePHD 03	5' GACTACCCATACAGGCTCTGG 3'	50		2169-2189
Anti-sens : PePHD 04	5' GCGTCCGCCAGGAGGAGGAA 3'	68		2508-2527
<u>Amorces spécifiques du génotype 3a</u>				
REGION HVRI, E2				
Sens : HVR1gt3 S1	5' TGGGATATGATGATGAATTGG 3'	60		1299-1319
Sens : HVR1gt3 S2	5' TGTAATGAGTCCATAAACACC 3'	62		1626-1646
REGION PePHD, E2				
Externes				
Sens : PePHD 31	5' CCCATACCGGCTTTGGCATT 3'	62		2174-2193
Anti-sens : PePHD 32	5' ATTTACCCGCACGTACCA 3'	60		2803-2821
Internes				
Sens : PePHD 33	5' CGATTTACCGCCGCTTGCAA 3'	62		2256-2275
Anti-sens : PePHD 34	5' GATATCGTCAGGATCAGCCA 3'	60		2547-2566

XIII.2. Analyse des sites de glycosylation

La prédiction des sites de N-glycosylation sur les glycoprotéines E1 et E2 amplifiés à partir des sérums des patients infectés par le VHC a été réalisée en utilisant le programme GLYCOSITE utilisable sur le site de Los Alamos « HCV Database » <http://www.hcv.lanl.gov/content/hcv-db/glycosite.html>.

XIII.3. Analyse de l'évolution génétique des variant viraux et de la pression sélection exercée sur les glycoprotéines E1/E2 (cas du patient P2)

Les analyses moléculaires décrites ci-dessous ont été réalisées en collaboration avec Frantz Depaulis (Laboratoire Ecologie et Evolution UMR 67625, Ecole Normale Supérieure UMPC-CNRS, Paris).

A fin d'identifier les positions variables sur la région de E1E2, un alignement a été réalisé avec les séquences des variants isolés à t1 et t2 avec le logiciel MAFFT (options par défaut) en utilisant comme groupe externe une séquence de génotype 3a (numéro d'accension D28917). Les délétions, données manquantes et séquences non codantes, n'ont pas été intégrées dans cette analyse. Un arbre phylogénétique préliminaire a été construit à l'aide du logiciel PHYML (Guindon et al. 2005) en utilisant le modèle d'évolution de Jukes et Cantor et la méthode de maximum de vraisemblance. Les analyses des paramètres évolutifs incluant le calcul des ratios dN (taux de mutations non synonymes)/dS (taux de mutations synonymes) tout au long de la séquence ont été réalisées avec le logiciel HyPhy (Pond et al. 2005), accessible depuis la plateforme en ligne DATAMONKEY [www.datamonkey.org, (Delport et al. 2010)]. Le choix du modèle de substitution nucléotidique a été réalisé sur la base des données fournies par la génération du premier arbre. Le modèle HKY85 a été choisi : il inclut la possibilité de fixer un ratio transition-transversion et d'autoriser une fréquence spécifique pour chaque nucléotide. Un arbre phylogénétique a été réalisé selon ce modèle par la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel PHYML (Guindon & Gascuel 2003).

Afin d'analyser les pressions de sélection exercées tout au long de E1 E2, deux méthodes ont été appliquées (i) la procédure FEL pour détecter les résidus soumis à pression négative (Kosakovsky Pond & Frost 2005) (ii) la procédure MEME pour identifier les résidus soumis à pression positive. La pression de sélection s'exerçant site par site a été calculée selon la méthode du Random Effect Likelihood (REL) à l'aide de l'application HyPhy (Pond et al. 2005) de la plateforme en ligne DATAMONKEY. Cette méthode permet de trier les codons en classe de (dN-dS). La probabilité que chaque site appartient à une classe donnée est en suite calculée. Dans le cas d'une pression de sélection positive, la valeur de dN-dS est significativement positive.

A l'aide du logiciel DNAsp (Librado & Rozas 2009), l'existence d'une différenciation génétique entre les séquences des variants isolés aux temps précoces t1 et t2 a été déterminée

en calculant l'indice de Wright (F_{ST}) (Hudson, Slatkin, et al. 1992), ce dernier comparant la distance intra et inter-population en utilisant la formule $(H \cdot b - H \cdot w) / H \cdot b$. H est le nombre de différence moyenne entre deux séquence ; b (*between*) correspond à la distance inter-population sur le temps et w (*within*) est la distance intra-population ().

XIV. Introduction par mutagenèse dirigée de mutations dans les gènes E1E2 clonés dans l'enveloppe

La mutagenèse dirigée consiste à introduire par PCR la mutation d'une base nucléotidique dans la séquence ADN d'intérêt (gène E1/E2). Nous avons déterminé la séquence de deux oligonucléotides adjacents de sens opposés et phosphorylés en 5' pour faciliter la liaison entre les deux extrémités du produit final de la PCR (Tableau 16). La mutation est incluse uniquement dans l'amorce sens. L'ensemble du plasmide PGEMTTM (Promega) contenant le variant d'enveloppe d'intérêt sert ici de matrice. Le mélange réactionnel est composé de la façon suivante : 1µg d'ADN, 20µM de chaque amorce, 10µL de dNTP (à 10mM) 10µL du tampon et 0,5µL de l'enzyme PhusionTM High-Fidelity DNA Polymérase (Finnzymes) générant des amplicons à bouts francs (Braibant et al., 2005). Les produits d'amplification sont soumis à une migration par électrophorèse dans un gel d'agarose au 1%. Les fragments contenant l'ADN (2000 pb) sont découpés et l'ADN est purifié avec le kit Nucleo Spin® Extract II, Macherey-Nagel (paragraphe XII.4). Le culot final est repris dans 40µL d'eau ultra pure. Puis une digestion est réalisée avec 1µL de l'enzyme DpnI (New England Biolabs) 1h à 37°C pour que la matrice non mutée soit être éliminée avant la transformation. En effet, cette enzyme est sensible à la méthylation de l'ADN. Elle reconnaît la séquence méthylée G^{m6}ATC et ne digère pas la séquence GATC, non méthylée. L'ADN a été préparé dans une bactérie qui effectue cette méthylation, une digestion par Dpn I digérera donc l'ADN « sauvage », et non l'ADN néo synthétisé. Une nouvelle étape de migration sur gel d'agarose et de purification précède l'étape de ligation avec l'enzyme T4 DNA Ligase (New England Biolabs) pendant 16h à 4°C. Les bactéries E. Coli DH5-αTM (Invitrogen) sont alors transformées avec cet ADN recircularisé, selon le protocole décrit au paragraphe XV.3.

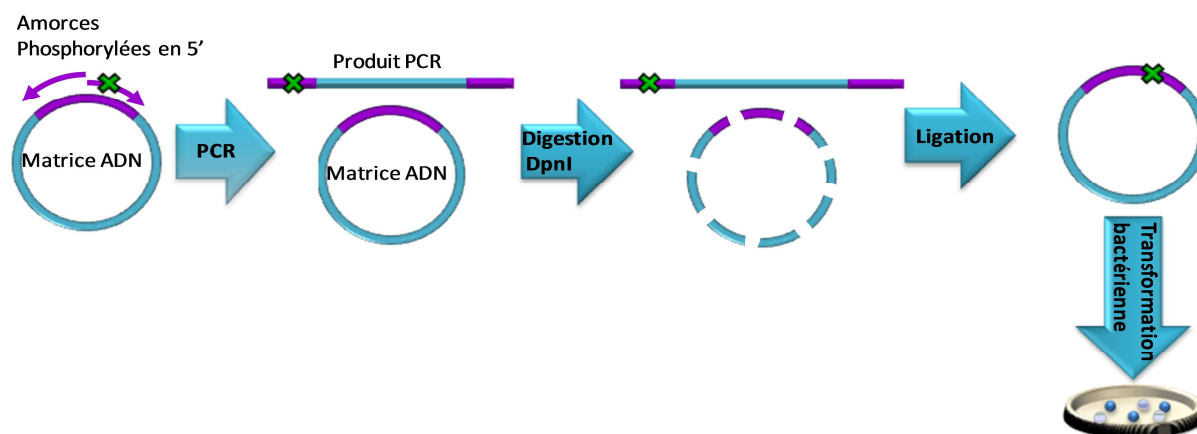


Figure 25: Représentation schématique de la stratégie de mutagenèse dirigée par PCR interne

-P1t2c16 M₄₉₉V: Mutant issu du clone 16 du prélèvement P2t1 et portant une valine en position 499 à la place d'une méthionine. Pour introduire cette mutation dans le clone majoritaire la substitution A>G en position 1236 a été nécessaire.



Figure 26: Représentation de la séquence partielle de l'enveloppe du clone P1c28c16 et de la localisation exacte de la position du nucléotide 1236 à muter.

-P1t2c16 N₅₇₆S: Mutant issu du clone 16 du prélèvement P1t2 et portant une valine en position 576 à la place d'une méthionine. Pour introduire cette mutation dans le clone majoritaire la substitution A>G en position 2275 a été nécessaire.



Figure 27: Représentation de la séquence partielle de l'enveloppe du clone P1t2c16 et la localisation exacte de la position mutée dans le nucléotide 2275 à muter.

La figure ci-dessous montre la séquence partielle de l'enveloppe du clone P1t2c16 et la localisation exacte de la position mutée.

Tableau 16: Caractéristiques des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Amorces	Séquences nucléotidiques	T _m	Positions en nucléotides selon H77
Mutation N645S			
P1t2c16-N ₁₆₀₁ S s	5' CGCTTGCA ^G TTGGACCAGAG 3'	64	2267-2287
P1t2c16-N ₁₆₀₁ S AS	5' GCTTCGAACCTGTGCTCCAC 3'	64	2248-2266
Mutation M499V			
P1t2c16-M ₅₆₂ V s	5'CGGCAC ^G TGACAGTACAGGA 3'	60	1230-1249
P1t2c16-M ₅₆₂ V AS	5' GCGAGGTGAGAAAGTGAACA 3'	64	1210-1229

S : sens ; AS : anti sens ; Les conditions utilisées pour l'amplification sont détaillées ci-dessous :

30 s. à 98°C, 35 cycles (10 s. à 98°C, 30 s. à 58°C, 1 min à 72°C, 15 min. à 68°C) et 10 min à 72°C

XV. Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt

XV.1. Linéarisation du plasmide pcDNA3.1(+)

Après linéarisation de 5µg du plasmide pcDNA3.1(+) par digestion avec 1µL l'enzyme EcoRI durant 30 min. à 37°C, et migration sur gel d'agarose, la bande d'ADN à 5000pb a été découpée et purifiée (paragraphe XII.4). Une déphosphorylation par action de 1µL de l'enzyme CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Biolabs) pendant 1h à 25°C (tampon NE 3) permet d'éviter la recircularisation du plasmide.

XV.2. Ligation de l'insert d'intérêt dans le plasmide pcDNA3.1(+)

La ligation de 100ng des enveloppes choisies avec 500ng de plasmide pcDNA3.1(+), linéarisé et déphosphorylé, a été effectuée pendant 16 heures à 16°C sous l'action d'une T4 ADN ligase (Biolabs).

XV.3. Transformation de bactéries compétentes pour l'amplification du plasmide

Vingt à 50 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes préalablement décongelées sur de la glace. Après une incubation de 30 min dans la glace, le mélange est soumis à un choc thermique (50 s à 42°C). Puis, les bactéries sont à nouveau placées sur la glace pendant 2 min avant d'être étalées sur milieu sélectif contenant un antibiotique (ampicilline, 100µg/ml).

XV.3.1 Vérification de la présence et du sens d'intégration de l'insert

XV.3.1.1 PCR sur colonies

Pour vérifier le sens de l'insert contenant les gènes d'enveloppe du variant d'intérêt, une des amorces doit être complémentaire d'une partie de la séquence de l'insert (et l'autre d'une partie de la séquence du plasmide pcDNA3.1+) (Tableau 15 et Tableau 17). Lorsque le sens de l'insert est correct, la migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% doit montrer théoriquement la présence d'un fragment d'ADN d'environ 1000pb.

Tableau 17: Caractéristiques des amorces utilisées pour la vérification de la présence et du sens de l'insert E1E2

Amorces	Séquences nucléotidiques	Tm	Positions en nucléotides sur pcDNA3.1+
Sens : CMV2a	5' GTGGATAGCGGTTTGACTCA 3'	60	646-665
Anti sens : BGH reverse	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	56	1022-1039

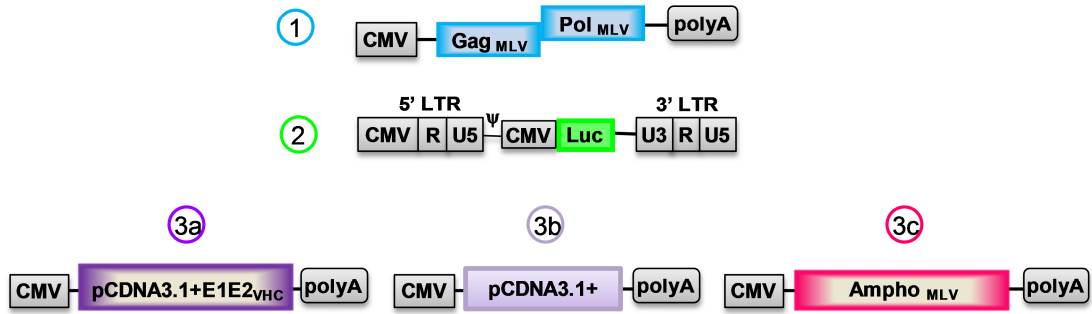
XV.4. Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait par la méthode de lyse alcaline en utilisant le kit NucleoBond[®] PC 500 (Marcherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN plasmidique est repris dans de l'eau p.p.i. puis quantifié par mesure de la densité optique à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU[®] 640 B). Sa pureté est estimée par le rapport DO260nm/DO280nm. Sa concentration est ajustée à 1µg/µl.

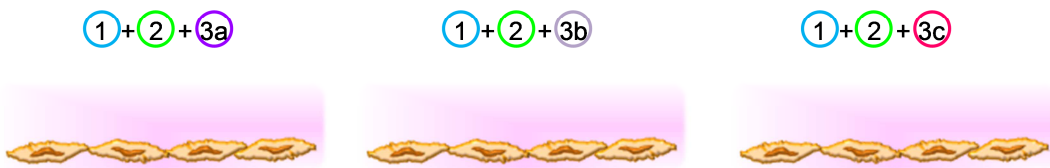
XV.4.1 Séquençage

Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 14 et le Tableau 15 . Les conditions de la PCR utilisée pour le séquençage sont détaillées dans le paragraphe XIII.1.

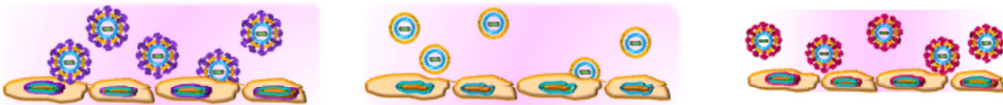
Représentation des plasmides utilisés pour la cotransfection des cellules 293T



1) Triple co-transfection des cellules 293T (37°C/6h)

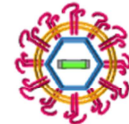
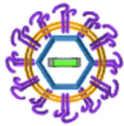


2) Production des pseudoparticules rétrovirales (37°C/48h-72h)



3) Récolte et filtration des surnageants de cultures contenant les

pseudoparticules rétrovirales:



3 a) portant l'enveloppe des différents variants du VHC (HCVpp)

3 b) sans enveloppe (dEnv)

3 c) portant l'enveloppe amphotrope du MLV (Ampho)

Figure 28 : Représentation schématique du protocole de production des différentes pseudoparticules rétrovirales.

XVI. Production des pseudoparticules rétrovirales

Ces pseudoparticules sont obtenues par incorporation des glycoprotéines du VHC à la surface de particules rétrovirales. Elles sont produites par transfection transitoire de cellules 293T au moyen de 3 vecteurs (Figure 28) :

1- un vecteur codant pour les protéines de nucléocapsides d'un rétrovirus (MLV) : pMN gag-pol (Paragraphe VIII.3.3).

2- un vecteur rétroviral défectif, portant un gène marqueur (luciférase) et une séquence d'encapsidation (ψ), nommé pTGLuc (Paragraphe VIII.3.2)

3-un vecteur codant pour l'un des protéines d'enveloppe suivantes :

- les glycoprotéines d'enveloppe E1/E2 du VHC d'intérêt dont une enveloppe témoin de génotype 1a (paragraphe VIII.3.1) ou celle isolé à partir d'un variant d'intérêt infectant un des patients.
- un plasmide d'expression vide (paragraphe VIII.2.1)
- une enveloppe amphotrope provenant duMLV (paragraphe VIII.3.4)

XVI.1. Transfection des cellules 293T


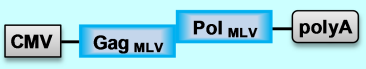
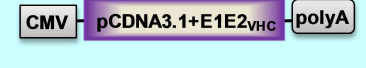
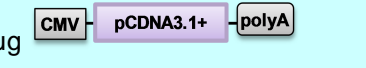

XVI.1.1 L'agent transfectant

Le polymère cationique à base de polyéthylèneimine (PEI) permet la formation d'un complexe avec l'ADN par liaisons ioniques. Ces complexes macromoléculaires chargés positivement sont capables d'interagir avec les membranes plasmiques des cellules (généralement anioniques). Ensuite, une endocytose des complexes se produit par les cellules et leur transport vers les endosomes/lysosomes. Un atome sur trois du polymère PEI est un azote permettant d'avoir des états de protonation différents selon le pH. Cette capacité de protonation confère à ce polymère la propriété d'« éponge à protons » qui permet de tamponner le milieu des vésicules acides, empêchant ainsi la dégradation de l'ADN transfecté. Ainsi, l'ADN peut être libéré dans le cytoplasme des cellules pour pouvoir être ensuite transporté vers le noyau en évitant sa dégradation par les nucléases cytoplasmiques.

XVI.1.2 Protocole de co-transfection

Les cellules 293-T sont ensemencées à 53.000 cellules/cm². Seize heures après, le milieu des cellules est changé par du milieu Optimed-GlutamaxTM (Gibco) préchauffé 20 minutes avant à 37°C. Ensuite, les complexes ADN-PEI sont préparés dans des tubes siliconés (Star-Lab, Réf. E1415-2600) pour éviter l'accrochage de l'ADN et du PEI aux parois du tube. Les différents mélanges réactionnels réalisés sont décrits dans le Tableau 18. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les complexes ADN-PEI formés sont déposés délicatement sur les cellules. Sept heures après, le tapis cellulaire est lavé avec du PBS préalablement chauffé à 37°C et incubé pendant 40 heures dans du milieu DMEM (Gibco) complété avec 10% sérum de veau fœtal (SVF), 2mM de Glutamax et 20 mM d'Hepes (Gibco).

Tableau 18: Conditions de transfection : description des mélanges réactionnels utilisés.

		Plaque 6 puits ^(a)	Flacon 25cm ²	Boîte 100cm ²	Flacon 75cm ²	Boîte 150cm ²
Solution A (tube A)	 μg	0.50	1.30	3	3.90	6
	 μg	0.45	1.17	2.70	3.51	10
	 μg	0.45	1.17	2.7	3.51	10
						
	 μg					
qsp X μL d'eau φ	50	130	300	390	915	
Solution B (tube B)	μL PEI	4.60	12	27.6	36	82
	μL d'eau φ	44.40	118	572.40	304.20	833
Tube A+B	μL du mélange/puits	100	260	600	780	1830

Le mélange contenu du tube « B » est déposé goutte par goutte avec une pipette sur le mélange du tube « A ». (a) les quantités sont indiquées par puit.

XVI.1.3 Récolte des surnageants de culture

Les surnageants issus de la culture des 293-T transfectées (ou pas) sont récoltés après 48 et 72h. Ce surnageant contenant les pseudoparticules virales est alors filtré à 0.22 μ m, aliquoté et conservé à 4°C pendant 15 jours ou à -80°C (si durée plus longue de conservation souhaitée).

XVI.2. Vérification de la production

La production de lumière lors de l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine est une réaction catalysée par la luciférase en présence d'ATP et de magnésium. Les cellules 293-T transfectées sont lavées une fois dans du PBS (Gibco) 72 heures après la transfection. Elles sont ensuite lysées avec du tampon Cell Culture Lysis Reagent 5X de Promega à 1X (1170 μ L pour un flacon de 75 cm²). La quantification de l'activité luciférase est réalisée dans une plaque 96 puits blanche à fond plat (Greiner Bio-one) avec 5 μ L de lysat déposés préalablement. Une première lecture (L_1) de la luminescence est réalisée avec le luminomètre Centro LB 960, (Berthold Technologies) durant 10 sec. Une deuxième lecture (L_2) est réalisée pendant 10 sec. après injection de 20 μ L du substrat (Luciferase Assay System, Réf. E1500, Promega). Le résultat final de la lecture de la luminescence (L_F) est obtenu après soustraction de L_2 à L_1 .

XVI.2.1 Quantification de l'ARN de la luciférase

L'extraction d'ARN est réalisée avec l'extracteur automatique «EZ1 Advanced XL, Qiagen» en utilisant le kit EZ1 Virus Mini Kit v 2.0, Qiagen à partir de 100 μ L de surnageant contenant les HCVpp. L'extrait d'ARN a été repris dans un volume final de 60 μ L. Une digestion avec 1 μ L de l'enzyme ADNase (Turbo ADNase, Ambion) à 37°C a été faite afin de digérer les possibles traces d'ADN plasmidique utilisées pour la transfection des cellules productrices 293-T. L'élimination de possible traces d'ADNase a été réalisée par purification sur colonne (RNA clean-up, MN). Cet ARN purifié a été soumis à une transcription inverse (avec l'enzyme Super Script III, Invitrogen) 0.2* μ L en suivant les conditions déjà décrites au paragraphe XII.2. L'ADNc ainsi produit a été quantifié par PCR en temps réel en utilisant l'appareil Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) et à l'aide du réactif (Roche, Mannheim, Germany). Ce dernier contient outre les tampons et l'ADN Taq polymérase, le SYBR Green I, agent intercalant de l'ADN double brin permettant de suivre l'évolution de la

fluorescence en fonction de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle de PCR. Dans une plaque 96 puits, chaque mélange réactionnel est composé de la manière suivante : 2 µl d'ADNc, 0.1µl d'amorce à 100mM et 17.8 µl de réactif Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kit. Les amorces choisies pour amplifier le gène de la luciférase *Firefly* sont décrites dans le Tableau 19.

Tableau 19: Description des amorces utilisées pour l'amplification du gène *Luc* « *Firefly* »

Amorce	Séquence	Position dans le gène <i>Luc</i>	Référence
Sens	5'-CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGA-3'	72	(Maekawa et al. 2008)
Antisens	5'-ATTTGTATTCAGCCCATATCGTTT-3'	224	

L'étape de dénaturation de l'ADN est réalisée à 95°C pendant 5 min. L'étape d'amplification est programmée sur 45 cycles qui se déroulent de la façon suivante : activation de la Taq polymérase (Hot start) à 95°C pendant 10 sec, hybridation des amorces à 60°C pendant 10 sec et élongation à 72°C pendant 10 sec. La PCR est suivie d'une étape de fusion des produits de PCR ce qui permet de les caractériser par leur point de fusion et de contrôler la spécificité de la réaction consistant en 1 cycle à 95°C pendant 5sec, 65°C pendant 1min et finalement 97°C pendant 30sec à 40°C.

Le nombre de copies d'ADNc est calculé par comparaison avec des dilutions en série d'un facteur 100 du plasmide pTG-Luc (de 7267pb à une concentration de 1µg/µL.), c'est-à-dire de 10¹⁰ à 10². Le nombre de copies d'ARN codant pour la luciférase est ensuite déduit à partir du nombre de copies d'ADNc. Chaque mesure est faite en double et une moyenne arithmétique des valeurs est calculée.

XVI.2.2 Etude de l'expression des protéines E1/E2 par Western-Blot

XVI.2.2.1.1 Lysat des cellules 293-T transfectées

Soixante douze heures après a transfection, après transfection des cellules, suivie d'une incubation de 72 heures, les cellules ont été lavées avec du PBS, puis lysées avec le tampon de lyse Cell Culture Lysis Reagent 5X de Promega à 1X [paragraphe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**]. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 14000 g à 4°C. Dans le surnageant, du tampon Laemmli est ajouté. Il est ensuite aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à la réalisation du western blot.

XVI.2.2.1.2 Surnageants de culture des 293-T transfectées

Le surnageant de culture est déposé dans un tube dédié à l'ultracentrifugation « Beckman ⁹/₁₆ x3 ¹/₂ in. (14x89mm) » contenant 2 mL d'une solution de sucrose (dilution

20% dans du PBS et filtré à 22 μ m). Une ultracentrifugation est réalisée avec le rotor SW41 [REF : 331372 (Polyallomer)] à 40.000g pendant 1h30. Les culots sont repris avec 20 μ L du tampon Laemmli et conservés à -80°C jusqu'à la réalisation du Western blot.

Avant la réalisation du Western blot, du beta-mercaptoéthanol (5%) est ajouté respectivement aux lysats cellulaires (20 μ L) et aux pseudoparticules (20 μ L) décongelés pour éviter la régénération des ponts disulfure. La dénaturation des protéines est alors réalisée à une température de 95°C pendant 4 minutes.

XVI.2.2.2 Électrophorèse en gel d'acrylamide et transfert sur membrane

Vingt microlitres d'échantillon sont soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 10% (Harlow et Lane, 1988) dans un tampon de migration SDS 10%, pendant 1 heure 30 min. sous une tension de 100 V. Elle est suivie d'un transfert actif (Mini Trans-Blot[®], Biorad) de 1 heure à 100V dans un tampon TG 10 X (Euromedex), méthanol 1% sur une membrane PVDF (Hybond-P PVDF Membrane de GE[™] Healthcare) préalablement incubée 30 secondes dans du méthanol pur.

XVI.2.2.3 Saturation et incubation de la membrane

Les étapes suivantes ont été réalisées avec le système sous vide SNAP i.d.[™] (Millipore) selon les instructions du fournisseur. Ce système consiste à faire passer la solution de saturation et les dilutions d'Ac à travers la membrane en optimisant ainsi le contact des anticorps avec les protéines d'intérêt transférés sur la membrane. Les étapes sont les suivantes : 1 à 2 min avec le tampon de saturation (Tris-HCl 50 mM [pH 7.5], NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% et lait en poudre 0.5%), 10 min. d'incubation avec le tampon de saturation contenant les anticorps primaires (Tableau 11), 5 min. de lavage avec du PBS, 10 min. d'incubation avec l'Ac secondaire (Tableau 12), 5 min. de lavage avec une solution de PBS et lavage final avec de l'eau.

XVI.2.2.4 Révélation en électroluminescence sur film

Cette révélation a été effectuée avec le kit Existing ChemiLuminescent Plus Western blotting detection reagents[®] (Amersham Biosciences) selon les instructions du fournisseur. Un millilitre de la solution A est mélangé à 4mL de la solution B. La membrane est incubée durant 1 minute. La membrane sensibilisée avec l'agent ECL est mise en contact avec un film CL-XPosure[™] de Thermo Scientific, dans une cassette radiographique. Après 5 min., le film est immergé dans le révélateur Kodak[®] de préparation extemporanée jusqu'à apparition

des bandes attendues. Le film est alors rincé dans l'eau et immergé dans le fixateur Ilford Hypan Rapid® jusqu'à la transparence totale du film. Enfin, un dernier rinçage dans de l'eau est réalisé avant séchage final du film.

XVII. Etude de l'entrée dans des cellules hépatiques des HCVpp portant les enveloppes des variants isolés

Les cellules hépatiques Huh7 sontensemencées dans des plaques 48 puits avec 1mL par puits d'une suspension cellulaire à 20.000 cellules par mL. Seize heures après, le milieu est substitué par 300 µL de surnageant contenant les pseudoparticules rétrovirales produits en cellules 293-T transfectées (0). Après 6 heures d'incubation dans l'étuve, les surnageants de culture sont substitués par 1mL du milieu D-MEM complet. Après 72 heures d'incubation dans l'étuve, les surnageants de culture sont retirés et les cellules sont lavées délicatement avec 1 mL du PBS (Gibco) préchauffé à 37°C. Le tapis cellulaire est lysé dans 50 µL de tampon lyse Cell Culture Lysis Reagent 5X (Promega) dilué dans l'eau pure à 1X. Après une douce agitation orbitale à 4°C, la lecture au luminomètre s'effectue avec 20 µL de lysats des cellules transduites. L'entrée de chaque particule différente est testée en triple, c.à.d. en trois puits différents. De plus, elle est comparée à celle de la particule portant une enveloppe de référence de génotype 1a (paragraphe VIII.3.1)

XVIII. Etude de la sensibilité à la neutralisation autologue des HCVpp produites

Afin de tester la capacité des sérums des deux patients à neutraliser l'entrée des variants contemporains, les différentes HCVpp portant les enveloppes majoritaires isolées à différents temps sont pré-incubés avec les sérums séquentiels à une dilution 1/50, puis mis en contact avec les cellules cibles Huh7 en suivant la procédure déjà décrite au paragraphe XVII.

La sensibilité à la neutralisation (exprimé en %) sera déterminée en comparant l'infectivité des HCVpp testés en présence du sérum étudié par rapport à l'infectivité en présence d'un sérum témoin ($T_{Nég}$) à la même dilution (1/50). Elle est calculée selon la formule suivante : $100 * (1 - RLU_{\text{sérum témoin dilué au } 50^{\text{ème}}} / RLU_{\text{sérum testé dilué au } 50^{\text{ème}})$.

Les mesures d'infectivité seront réalisées pour chaque point en triple.

XVIII.1. Titrage des anticorps neutralisants dans les échantillons du patient N° 2

Différentes dilutions de sérums ont été effectuées avec les pseudoparticules portant l'enveloppe du variant majoritaire du premier prélèvement (1/25, 1/50, 1/100, 1/200 et 1/400). Puis, la dilution inhibitrice 50 (DI_{50}) a été calculée, c'est-à-dire la dilution de sérum capable d'inhiber de 50% l'entrée des HCVpp dans les cellules cibles.

Ce titrage est réalisé pour les prélèvements t1, t2, t3, t4, t5, t6, t7 et t8 du P2 par rapport à la particule P2t1c43-HCVpp.

RESULTATS

XIX. Cas du patient 1

XIX.1. Analyse des produits issus de l'amplification génique

XIX.1.1 Contrôle de l'amplification des gènes E1/E2 du VHC

L'amplification d'un fragment de 2036 paires de bases (correspondant aux gènes E1, E2, p7 et aux 280 derniers nt du gène de la capsid) s'est avérée positive pour le prélèvement P1t2, collecté 17 jours après le pic d'ALAT (Figure 29). Par contre, un échec d'amplification a été observé pour le prélèvement P1t1 même après plusieurs essais.

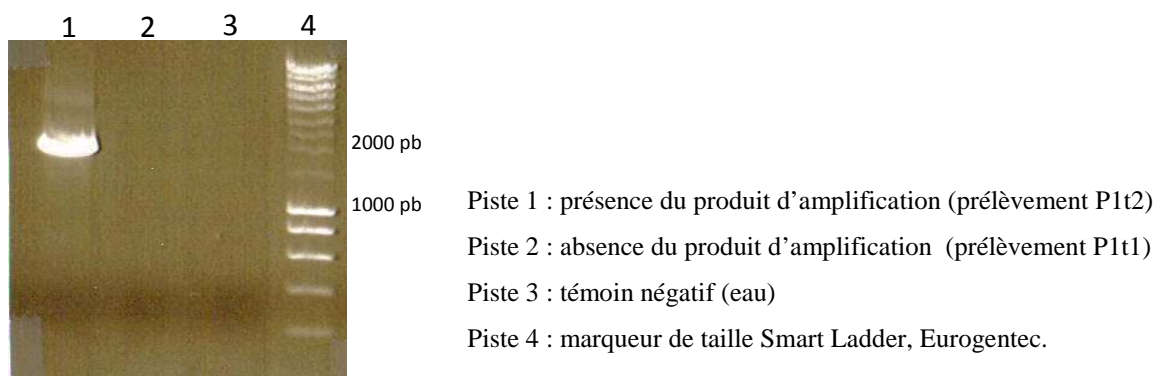


Figure 29: Analyse électrophorétique des produits issus de l'amplification par PCR des gènes E1 et E2 du VHC dans le cas du patient 1

XIX.1.2 Sélection des clones recombinants et analyse de leurs séquences

A l'issue d'une PCR sur colonies (paragraphe XV.3.1.1), 40 clones possédant l'insert d'intérêt ont été sélectionnés puis séquencés. Au total, une séquence complète des gènes codants pour les glycoprotéines d'enveloppe du VHC E1 et E2 (sans ambiguïté après l'analyse des électrophorogrammes) a pu être obtenue pour 33 clones.

Le Tableau 20 montre la position des mutations en acides aminés pour les 33 clones analysés par rapport à la séquence du variant majoritaire, correspondant à celle des clones 5, 9, 13, **16**, 22, 37. Les séquences correspondantes ont été soumises à GenBank (JQ285738-JQ285848)

XIX.2. Analyse des sites de N-glycosylation

XIX.2.1 Sur la glycoprotéine E1

Cinq sites de N-glycosylation ont été prédits avec le logiciel GLYCOSITE pour chacun des 35 clones : ils sont situés aux positions 196 (N1), 209 (N2), 234 (N3), 250 et 305 (N4), selon la numérotation de la polyprotéine précurseur de la souche H77. Ces sites correspondent à ceux décrits comme très conservés dans la littérature pour le génotype 1b (Francois Helle et al. 2007). Les pourcentages de conservation selon Helle *et al.* 2007 sont indiqués dans le Tableau 21.

XIX.2.2 Sur la glycoprotéine E2

Dix sites de glycosylation ont été prédits pour 33 clones avec le logiciel GLYCOSITE* : ils sont situés aux positions 417 (N1), 423 (N2), 430(N3), 448(N4), 532(N6), 540(N7), 556(N8), 576(N9), 623(N10), 645(N11). Ces sites correspondent à ceux décrits dans la littérature pour le génotype 1b (Francois Helle et al. 2007). Les pourcentages de conservation selon Helle *et al.* 2007 sont indiqués dans le Tableau 21. Le site N11 est absent pour le clone 28 (P1c28) en raison d'une mutation en position 645 (N>S) et non prédit pour le clone P1c36 en raison de la mutation T₆₄₇A. Notons que le site N5, peu conservé au sein du génotype 1b, est absent dans tous les clones.

Tableau 21: Sites de glycosylation prédits dans la glycoprotéine d'enveloppe E2 des variants issus du prélèvement P1t2.

	N1 ₄₁₇	N2 ₄₂₃	N3 ₄₃₀	N4 ₄₄₈	N5 ₄₇₆	N6 ₅₃₂	N7 ₅₄₀	N8 ₅₅₆	N9 ₅₇₆	N10 ₆₂₃	N11 ₆₄₅
% de conservation ^{a)}	99.5	100	98.1	97.7	17.8	100	97.7	99.5	98.6	99.5	99.5
P1c28	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
P1c36	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
Autres clones	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●

a) Pourcentage de conservation des sites de N-glycosylation au sein du génotype 1b du VHC selon l'étude Helle *et al.* 2007

○Site de glycosylation absent ou non prédit ; ●Présence du site de glycosylation

XIX.3. Récapitulatif des variants et des mutants choisis pour la production des HCVpp

Pour étudier la capacité des HCVpp correspondantes à entrer dans les cellules hépatiques humaines, les variants et mutants suivants ont été choisis :

- le variant majoritaire P1t2c16
- le variant minoritaire P1t2c28 possédant la mutation N₆₄₅S (dans le site E2N11) et la mutation M₂₉₉V en rapport au variant P1t2c16
- un mutant produit par mutagenèse portant uniquement la mutation M₂₉₉V vis-à-vis du clone majoritaire : P1t2c16M₂₉₉V
- un mutant produit par mutagenèse portant uniquement la mutation N₆₄₅S vis-à-vis du clone majoritaire : P1t2c16N₆₄₅S

Ces deux mutants ont été synthétisés pour étudier l'influence de la mutation N₆₄₅S dans l'entrée virale.

Tableau 22 : Récapitulatif des variants et des mutants étudiés pour leur capacité d'entrée dans des cellules Huh7

	Positionnement de mutations	P1t2c16	P1t2c28	P1t2M₂₉₉V	P1t2N₆₄₅S
E1	299	M	V	V	
E2	645 ^{a)}	N	S		S

Les variants désignés en gras sont ceux qui ont été générés par mutagenèse dirigée

a) Les variant P1t2c28 et le mutant P1t2N₆₄₅S possèdent une mutation en position 645 (site de glycosylation E2N11).

P1t2M₂₉₉V : La méthionine a été substituée par une valine en position 299.

P1t2N₆₄₅S : L'asparagine a été substituée par une sérine en position 645.

XIX.4. Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt

XIX.4.1 Quantification de l'ARN de la luciférase

Après une vérification de la transfection par mesure de l'activité luciférase sur le lysat des cellules 293-T transfectées et sur le surnageant de culture, une quantification de pseudoparticules produites est réalisée.

Le nombre de copies d'ADNc du gène de la Luciférase *Firefly* correspondant aux différentes pseudoparticules produites varient entre $5,5 \cdot 10^6$ et $13,8 \cdot 10^6$ par μL de surnageant de culture issu de cellules productrices 293T (Figure 31). Une « normalisation » de la quantité de pseudoparticules présentes dans les différents surnageants récoltés s'avère nécessaire pour réaliser une comparaison de l'infectivité des pseudoparticules portant les différentes enveloppes E1E2. Avant de réaliser la transduction des cellules Huh7, les différents surnageants ont tous été dilués pour obtenir une concentration de $5,5 \cdot 10^6$ copies d'ADNc.

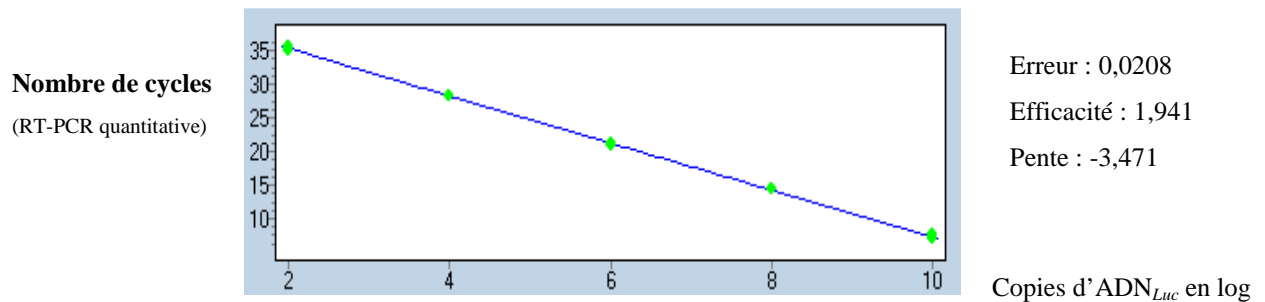


Figure 30 : Droite d'étalonnage présentant le nombre de copies du plasmide pTGLuc à partir de dilutions successives (10^{10} , 10^8 , 10^6 , 10^4 et 10^2)

Les mesures ont été réalisées en double pour chaque dilution

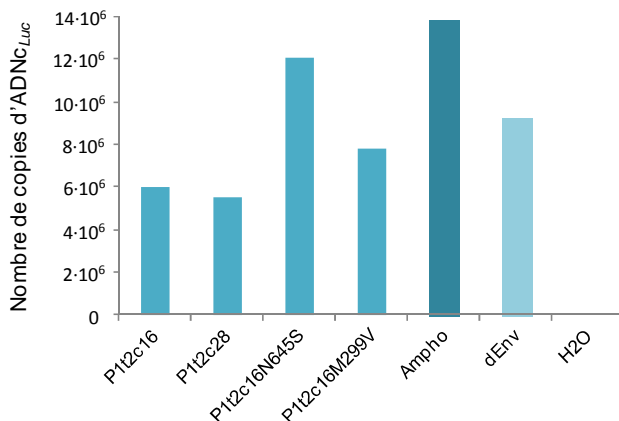


Figure 31: Nombre de copies d'ADNc par microlitre de surnageant, du gène de la Luciférase *Firefly* obtenues lors de la production des six pseudoparticules produites (cas du patient P1).

XIX.4.2 Vérification de l'expression des protéines de E1E2 à la surface des HCVpp produites

Selon les résultats du western-blot (Figure 33B), la protéine de capsid du MLV (27KDa) a été détectée pour toutes les HCVpp produites ainsi que pour les 3 pseudoparticules de contrôle (HCVpp-1a, dEnv et Ampho). E1 (31KDa) a été détecté pour toutes les HCVpp produites, sauf pour la particule de contrôle HCVpp-1a lorsque l'anticorps monoclonal H111 est utilisé (ligne 7). En effet, il existe des différences des séquences entre l'épitope reconnu par H-111 et la séquence d'enveloppe portée par la particule témoin HCVpp-1a (Figure 32). Par contre, E1 a été détecté pour cette particule avec l'anticorps monoclonal A4 (ligne 7'). L'absence du site de N-glycosylation E2N11 a été confirmée par le léger décalage dans la migration de la glycoprotéine E2 des variants P1t2c28 et P1t2c16N₆₄₅S (lignes 2 et 4 respectivement). Le même niveau d'expression de E1 et E2 a été observée pour les quatre HCVpp produites portant des enveloppes dérivées des variants isolés du patient 1 (lignes 1-4).

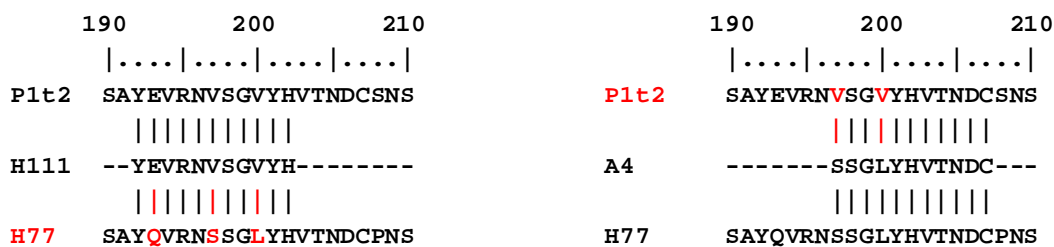


Figure 32: Alignement des séquences des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux A4 et H111 avec les séquences de la souche H77 et celles des variants P1t2c16 et P1t2c28.

XIX.5. Capacité d'entrée des HCVpp portant différentes enveloppes dérivées des variants isolés du patient 1

Les sept particules produites, sauf la particule témoin ne portant pas d'enveloppe (dEnv), ont montré leur capacité à entrer dans des cellules Huh7 (Figure 33). L'entrée des deux particules portant les enveloppes des variants mutés en E2N11 (HCVpp P1t2c28 et P1t2c16N645S) est réduite respectivement d'un facteur 2 et 2,5 par rapport aux pseudoparticules portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c16). Par contre, la mutation M₂₉₉V, présente sur E1, n'affecte pas la capacité d'entrée dans les cellules Huh7, contrairement à la mutation N645S.

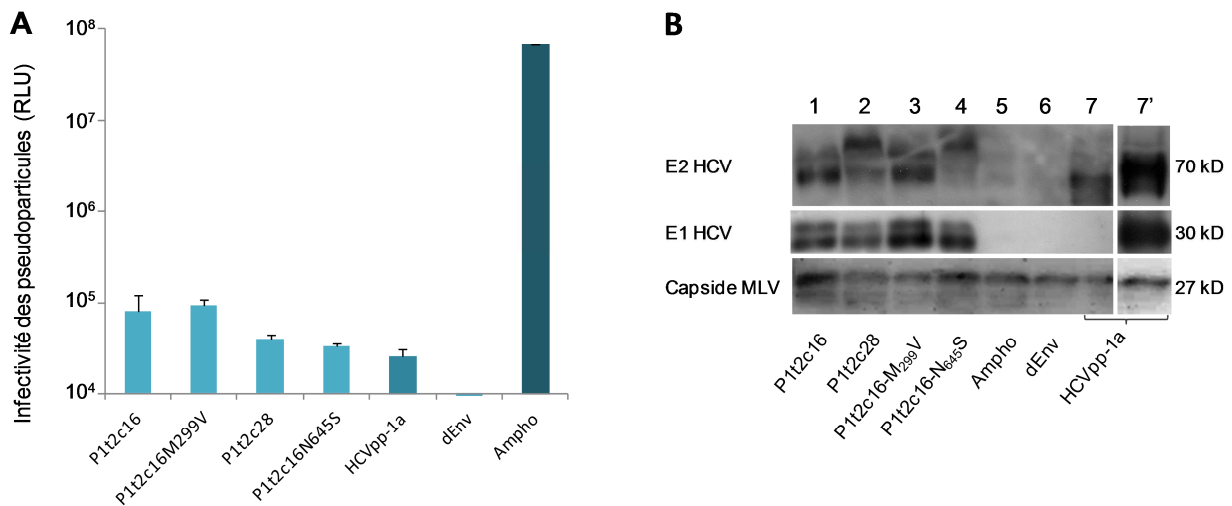


Figure 33: Capacité d'entrée des HCVpp portant les glycoprotéines E1E2 correspondants au variant majoritaire, à un variant minoritaire sélectionné et à deux mutants.

A) Comparaison de l'infectivité des HCVpp portant les glycoprotéines E1E2 des variants dérivés du patient P1 : variant majoritaire (P1t2c16, ligne 1), variant minoritaire singulier (P1t2c28, ligne 2) et les mutants suivante (P2t2c16M₂₉₉V, P2t2c16N₆₄₅V (lignes 3 et 4 respectivement). La pseudoparticule rétrovirale nommée HCVpp-1a (lignes. 7 et 7') a été utilisée comme contrôle positif de l'entrée. Des particules rétrovirales sans enveloppe (dEnv, ligne 6) ou portant l'enveloppe amphotrope du MLV (Ampho, ligne 5) ont été utilisées respectivement comme contrôle négatif et positif de l'entrée dans des cellules Huh7. Pour chaque virus pseudotypés, les expériences de transduction des cellules Huh7 ont été répétées quatre fois. L'efficacité de la transduction des cellules Huh7 a été déterminée en mesurant des unités relatives de luminescence (RLU). La moyenne géométrique et les écartypes correspondants ont été calculés.

B) Vérification par western-blot de l'expression des glycoprotéines d'enveloppe du VHC et de la capside du MLV à partir pseudoparticules rétrovirales récupérées après filtration et ultracentrifugation des surnageants de culture des cellules 293-T transfectées. Lignes de 1 à 7 : incubation avec l'anticorps monoclonal H111 (anti-E1) ; ligne 7' : incubation avec l'anticorps monoclonal A4 (anti-E1). Lignes de 1 à 7' : incubation avec l'anticorps monoclonal 3-11(anti E2) et avec un anticorps monoclonal dirigé contre la capside du MLV.

XIX.6. Etude de la réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c16)

La Figure 34 A présente les niveaux d'infectivité de la particule P1t2c16-HCVpp (en RLU) en présence des sérums autologues séquentiels. Des cellules Huh7 ont été utilisées pour réaliser ces expériences de transduction. La réponse neutralisante autologue dirigée contre l'enveloppe du variant majoritaire P1t2c16 est détectable (>50%) dans les sérums prélevés des 17 jours après le pic d'ALAT et jusqu'à 25 mois après (Figure 34 B). Le pourcentage maximum de détection a été observé au deuxième mois (77%). La réponse neutralisante devient indétectable entre 30 et 38 mois après la primo-infection.

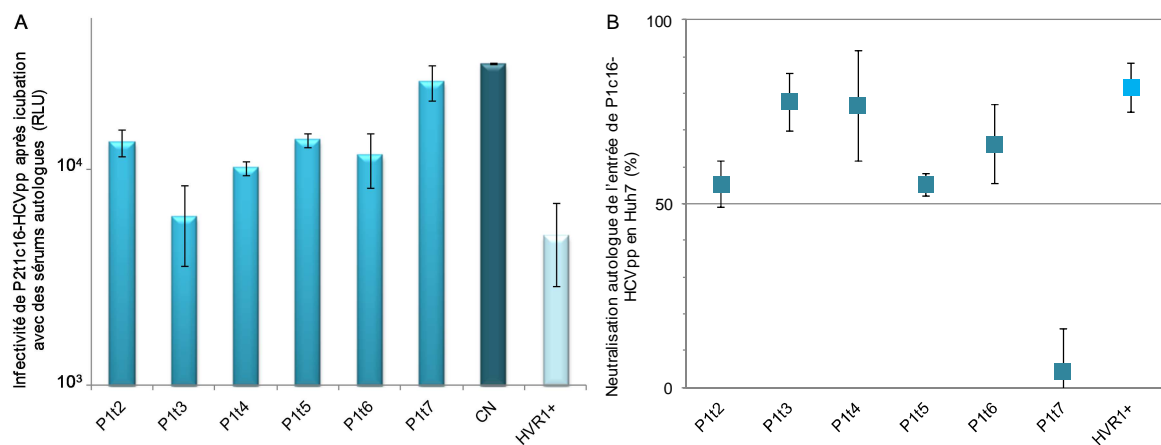


Figure 34 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps contre des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire isolé 17 jours après le pic d'ALAT chez le patient 1.

Les sérums ont été dilués à 1:50 et les résultats de tests d'infectivité sont exprimés en RLU. Le sérum témoin (CN) est un mélange de 100 sérums de donneurs de sang pour lesquels la détection des Ac anti-VHC et de l'ARN du VHC sont négatifs. Le sérum nommé (HVR1+) est un mélange de 3 sérums présentant une activité anti-HVR1 positive, selon les résultats d'un immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics).

XIX.7. Etude de la réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c28)

Le variant minoritaire P2t2c28 porte les mutations M₂₉₉V et N₆₄₅S, cette dernière entraînant la perte du site de N-glycosylation E2N11, (Tableau 22). L'activité neutralisante autologue dirigée contre l'enveloppe de ce variant a été détectée entre deux et 30 mois après le pic d'ALAT (Figure 35). Toutefois, une certaine fluctuation de l'activité neutralisante a été observée pendant cette période (non détectable à 3 mois). Il est observé parallèlement une neutralisation de l'entrée de ce variant par un mélange de sérums hétérologues (appelé HVR1+). Des expériences de titrage d'anticorps neutralisants n'ont pas pu être réalisées due à la quantité insuffisante du sérum.

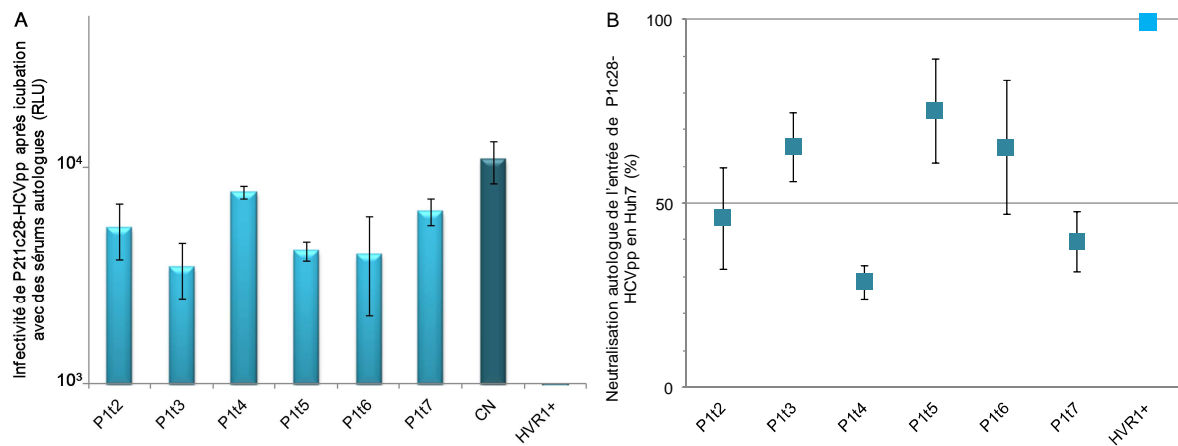


Figure 35 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps contre des HCVpp portant l'enveloppe d'un variant minoritaire isolé 17 jours après le pic d'ALAT chez le patient 1 et muté dans site de N-glycosylation E2N11 (P1t2c28)

Les sérums ont été dilués à 1:50 et les résultats de tests d'infectivité sont exprimés en RLU. Le sérum témoin (CN) est un mélange de 100 sérums de donneurs de sang pour lesquels la détection des Ac anti-VHC et de l'ARN du VHC sont négatifs. Le sérum nommé (HVR1+) est un mélange de 3 sérums présentant une activité anti-HVR1 positive, selon les résultats d'un immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics)

XX. Cas du patient 2

XX.1. Analyse des produits issus de l'amplification génique

XX.1.1 Contrôle de l'amplification des gènes E1/E2 du VHC

L'amplification d'un fragment de 1778 paires de bases [1778 nt, de 840 à 2618, selon souche référence D17763 (gt 3a) et de 840 à 2598 selon la souche de référence H77 (gt1a)] correspondant aux gènes E1, E2, et aux 78 derniers nt du gène de la capsid a été réalisée. Elle s'est avérée positive pour les prélèvements P2t1 et P2t2 collectées respectivement au moment du pic d'ALAT et 17 jours après (Figure 36).

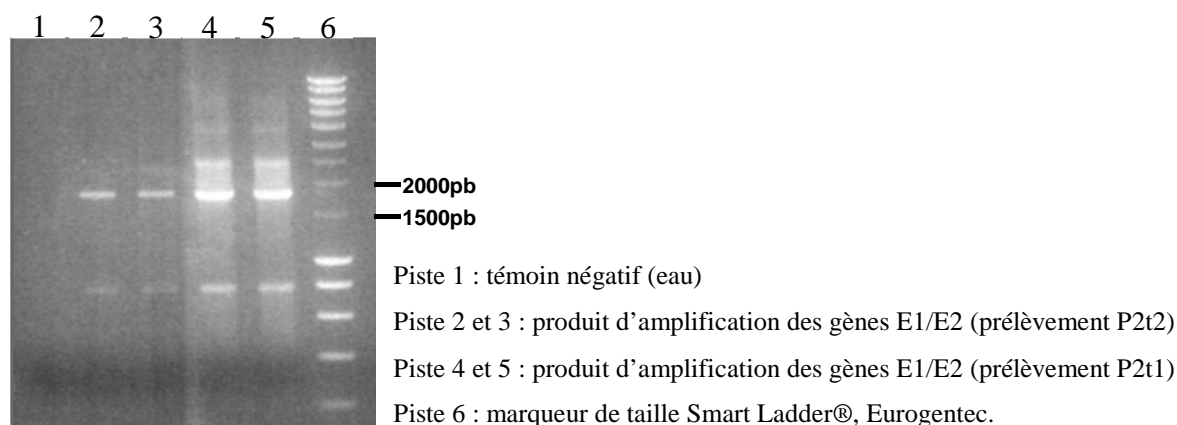


Figure 36: Photographie du gel d'électrophorèse de l'ADN issu de l'amplification par PCR des gènes E1 et E2 du VHC dans le cas du patient 2, prélèvements P2t1 et P2t2.

XX.1.2 Sélection des clones recombinants et analyse de leurs séquences

Cent colonies de bactéries transformées ont été sélectionnées. A partir de chacune d'entre elles, une l'amplification de la région PePHD (310 nt) des différents variants isolées dans le prélèvement P2t1 et P2t2 a été réalisée (paragraphe XV.3.1.1). Les 100 plasmides contenaient le fragment d'enveloppe E1E2 inséré. Tous ces inserts ont été séquencés. Au total, une séquence complète des gènes codants pour les glycoprotéines d'enveloppe du VHC E1 et E2 (sans ambiguïté après l'analyse des électrophorégrammes) a pu être obtenue pour 80 clones, 41 et 39 respectivement pour P2t1 et P2t2.

Le Tableau 23 montre la position des mutations en aa pour ces 80 clones. Les différences de séquences sont montrées par rapport à la séquence majoritaire issue du

Les positions des mutations sont indiquées selon la numérotation de séquence de référence H77. Les séquences sont représentées en aa (code à une lettre).

Pour le prélèvement P2t1, les séquences des clones 7, 9, 17, 21, 23, 24, 34, 36, 38, 41, 42, 43 sont identiques. Les clones 8, 29 et 49 ont une séquence identique. Même observation pour les clones 4 et 26 qui portent la même séquence que le clone majoritaire du deuxième prélèvement (P2t2c6). Tous les autres clones ont été retrouvés à une fréquence de 1/41. Pour le prélèvement P2t2, les séquences des clones 6, 9, 12, 22, 41 sont identiques entre elles et représentent une des séquences majoritaires, P1t2c6. Même observation pour les clones 2, 3, 13, 32, 34, 35, 46, 48 représentant l'autre séquence majoritaire P2t2c34. Tous les autres clones ont été retrouvés à une fréquence de 1/39 α : Site liaison CD81 ; N : Site de N-glycosylation muté

XX.2. Evolution entre P2t1 et P2t2 de la population virale

Pour analyser l'évolution génétique de l'enveloppe au temps précoce de la primo-infection, 41 et 39 clones de l'enveloppe complète E1/E2 ont été séquencés respectivement pour P2t1 et P2t2.

La Figure 37 montre la fréquence de détection (en %) des différents variants de l'enveloppe E1/E2 au sein des prélèvements isolés à t1 (a) et à t2 (b).

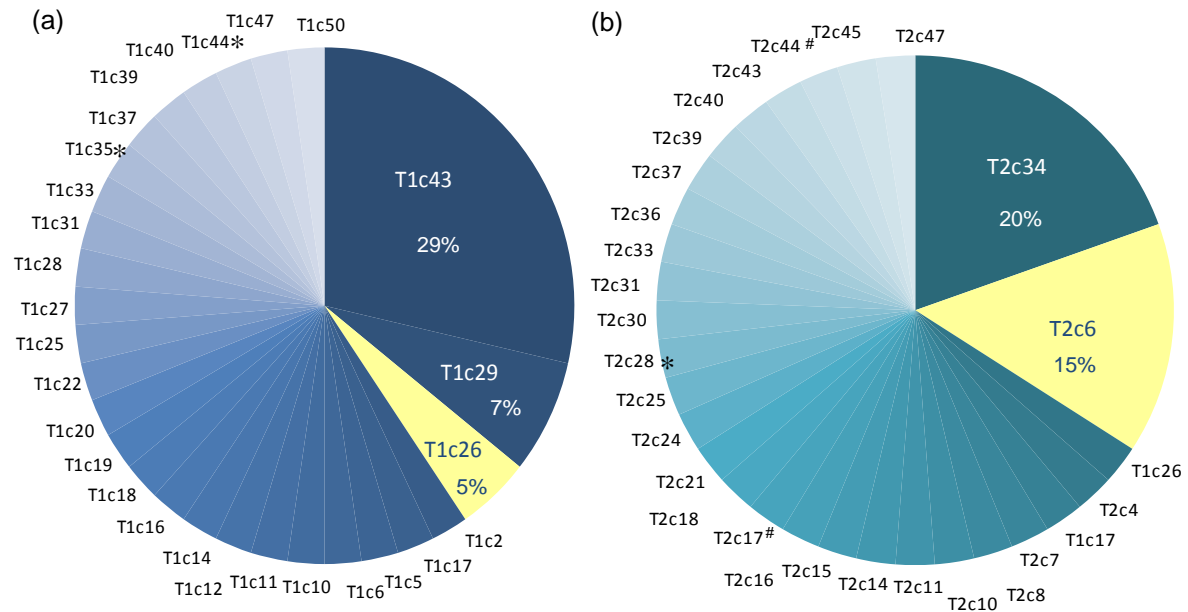


Figure 37 : Récapitulatif des variants de l'enveloppe E1/E2 isolés dans les deux prélèvements sériques contemporains des phases précoces de la primo-infection (P2t1 et P2t2).

Lorsque le pourcentage n'est pas mentionné, le variant est représenté à hauteur de 2,5 % pour P2t1 et de 2,5% pour P2t2. * variants portant une ou plusieurs délétions ; # variants portant un codon stop.

Notons que le clone P2t1c26, minoritaire dans le premier prélèvement, a très rapidement émergé, devenant majoritaire dans le prélèvement t2 distant seulement de 17 jours par rapport à t1: la séquence des deux clones P2t1c26 et P2t2c6 étant identique sur E1, E2 et le peptide signal situé en C terminal de la capsid. Signalons la présence d'une seule mutation entre les deux séquences majoritaires isolées à t2, situé dans la capsid P₁₇₂S (Tableau 23).

La valeur de l'indice de Wright ($F_{ST} = 0.65$; $p < 0.001$) montre qu'il existe une différenciation génétique significative entre les variants isolés aux deux temps. De plus, l'analyse phylogénétique montre que les variants isolés respectivement à t1 et t2 appartiennent à deux clades différents (Figure 38).

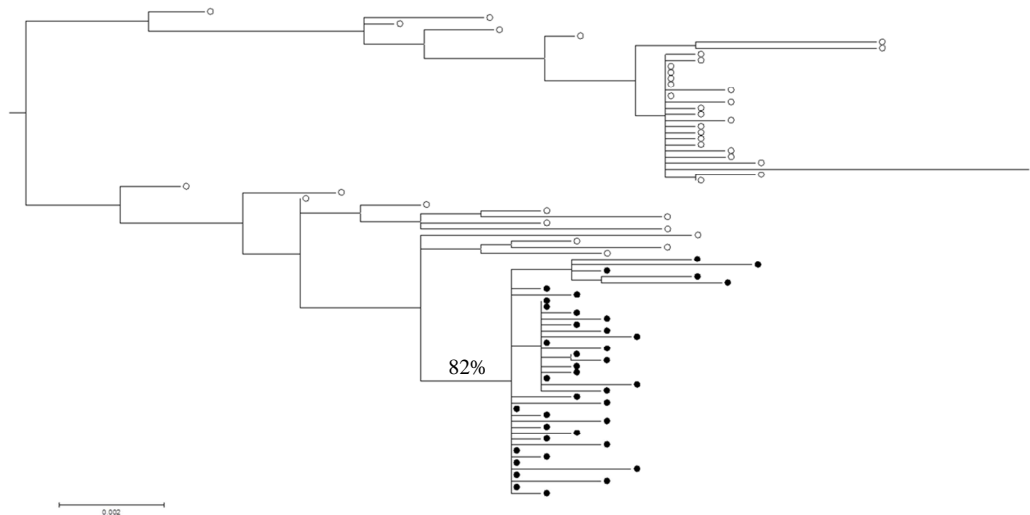


Figure 38 Arbre montrant la répartition génétique phylogénétique des variants identifiés à t1 et t2.

Méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution KHY85. La valeur de *bootstrap* est indiquée au niveau de l'embranchement séparant t1 et t2. (o)=t1 ; (●)=t2.

XX.3. Etude des sites soumis à pression de sélection

L'analyse des sites soumis à pression de sélection montre la présence de six sites sur lesquels s'exercent une pression négative: aa 384 ($p < 0,05$), 268, 482, 496, 529 et 730 ($p < 0,1$) (Figure 39). L'application de la technique MEME montre la présence d'un site soumis à une forte pression de sélection positive, localisé dans HVR3 (aa 459 ; $p < 10^{-4}$).

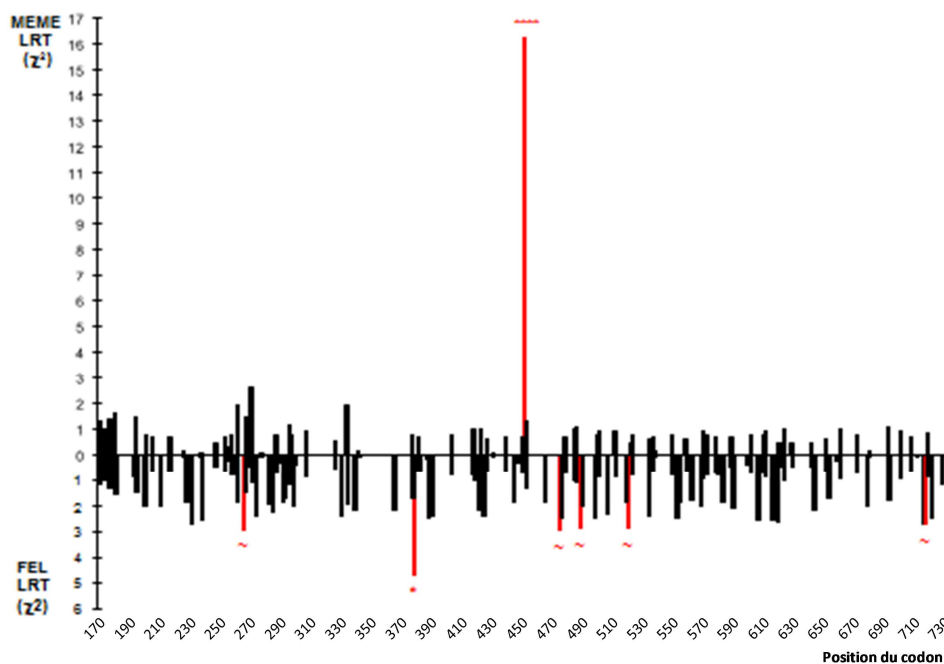


Figure 39 : Représentation de la pression-sélection sur chaque résidu en aa des glycoprotéines E1 et E2.

XX.1. Analyse des sites de N-glycosylation

XX.1.1 Sur la glycoprotéine E1 :

Quatre sites de glycosylation ont été prédits pour les 80 clones. Ils sont situés aux positions 196(N1), 209(N2), 234 (N3) and 305 (N4). Ces sites correspondent à ceux décrits dans la littérature pour le génotype 3a (Francois Helle et al. 2007). Ces sites sont conservés pour les 83 clones séquencés (Tableau 24).

Tableau 24: Description des sites de glycosylation dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 des variants issus du patient 2

	N1 ₁₉₆	N2 ₂₀₉	N3 ₂₃₄	N5 ₃₀₅
% conservation ¹	75	100	100	100
Tous les clones	●	●	●	●

¹ Selon l'étude Helle *et al.* 2007 pour une souche du VHC de gt 3a

○ Absence du site de glycosylation ; ● Présence du site de glycosylation

XX.1.2 Sur la glycoprotéine E2

Dix sites de glycosylation ont été prédits aux positions 417 (N1), 423 (N2), 430 (N3), 448 (N4), 476 (N5), 532 (N6), 556 (N8), 576 (N9), 623 (N10) et 645(N11). Ces sites correspondent à ceux décrits dans la littérature pour le génotype 3a (Helle et al. 2007). Selon le logiciel « GLYCOSITE », ces sites sont conservés pour 76 des 80 clones séquencés (

Tableau 25) sauf pour le(s) variants :

- P2t1c40 et P2t1c27 qui possèdent la mutation T₅₃₄A dans le domaine du site E2N6
- P2t2c10 qui possède la mutation S₅₈₁P au niveau du site E2N9
- P2t2c37 qui possède la mutation T₄₂₄A au niveau du site E2N2

Tableau 25: Description des sites de glycosylation dans la glycoprotéine d'enveloppe E2 des variants issus du patient 2

	N1 ₄₁₇	N2 ₄₂₃	N3 ₄₃₀	N4 ₄₄₈	N5 ₄₇₆	N6 ₅₃₂	N7 ₅₄₀	N8 ₅₅₆	N9 ₅₇₉	N10 ₆₂₃	N11 ₆₄₅
%conservation ¹	100	98.5	100	100	100	97	0	86.4	98.5	98.5	100
P2t1c40	●	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●
P2t1c27	●	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●
P2t2c10	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●	●
P2t2c37	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●
Autres clones	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●

¹ Selon l'étude Helle *et al.* 2007 pour une souche du VHC de gt 3a

○ Absence du site de glycosylation ; ● Présence du site de glycosylation

XX.2. Récapitulatif des variants et des mutants choisis pour la production des HCVpp

Les mutations des différents clones sélectionnés pour la production de pseudoparticules sont représentées par rapport au variant majoritaire du premier prélèvement (P2t1) (Tableau 26). Il s'agit des variants majoritaires de chaque prélèvement (P2t1c43 et P2t2c6 et c34) et des variants possédant une ou plusieurs des mutations ayant contribué à l'évolution de P2t1c43 vers P2t2c6 et c34 (P2t1c25, c29, c40 et c47). En effet, les clones majoritaires du second prélèvement (P2t2c6 et c34) possèdent respectivement 4 et 5 mutations par rapport au clone majoritaire du premier prélèvement (substitutions situées en positions 172, 258, 260, 303 et 522).

Notons que le clone P2t1c40 possède également une mutation remarquable dans un site de glycosylation (N6 dans E2) prédit avec le logiciel N-GLYCOSITE. Pour le second

prélèvement, les variants choisis possèdent des mutations singulières sur des sites de glycosylation E2N2 et E2N9, ou dans un domaine de liaison au CD81 (Tableau 26).

Tableau 26 : Récapitulatif des variants étudiés pour la capacité d'entrée des HCVpp correspondantes dans les cellules Huh7

Nom	Fréquence	C	E1					E2				
		172	258	260	298	303	309	424 ^{a)}	522 ^{b)}	534 ^{c)}	582 ^{d)}	635
P2t1c43	10/41	S	V	R	Q	T	P	T	K	T	S	R
P2t1c25	1/41								R			
P2t1c47	1/41					A						
P2t1c40	1/41		I	S						A		
P2t1c29	3/41		I	S		A						
P2t2c6	6/39		I	S		A			R			
P2t2c34	7/39	P	I	S		A			R			
P2t2c37	1/39		I	S		A		A	R			G
P2t2c15	1/39	P	I	S		A	L		R			
P2t2c10	1/39	P	I	S	R	A			R		P	

Les différences de séquence en acides aminés sont montrées par rapport à la séquence majoritaire correspondant à celle du clone P2t1c43. Les positions sur le génome sont indiquées en prenant la souche H77 comme référence pour la numérotation. Les variants désignés en gras sont les clones majoritaires.

^{a)} Le variant P2t2c37 possède une mutation en position 424 (site de glycosylation de E2 connu : N2). Ce site est situé dans un des domaines de fusion de E2 (417-433).

^{b)} Le variant P2t2c25 et tous les variants de t2 possèdent une mutation en position 522 (dans le domaine de fixation de CD81)

^{c)} Le variant P2t1c40 possède une mutation en position 534 (site de glycosylation de E2 connu : N6).

^{d)} Le variant P2t2c10 possède une mutation en position 582 (site de glycosylation de E2 connu : N9), située dans la région intergénomique IgVR.

XX.3. Production des HCVpp portant les enveloppes d'intérêt

XX.3.1 Quantification de la production d'ARN codant pour le gène *Luc*

Les nombres de copies d'ADNc du gène *Luc* présents dans le surnageant de culture issu de chaque co-transfection sont présentés dans la Figure 40. Avant de réaliser la transduction des cellules Huh7, les différents surnageants ont tous été dilués pour obtenir $5,5 \cdot 10^6$ copies d'ADNc (cf. droite d'étalonnage, Figure 30).

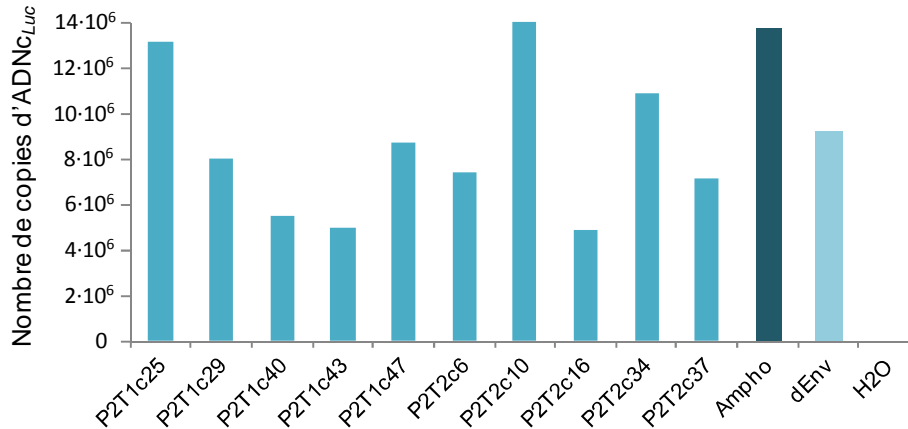


Figure 40: Nombre de copies d'ADNc du gène de la Luciférase *Firefly* obtenues par microlitre de surnageant lors de la production des douze pseudoparticules (cas du patient P2)

XX.3.2 Vérification de l'expression des protéines de E1E2 à la surface des HCVpp produites

Selon les résultats du western-blot, la protéine de capsid du MLV (27KDa) a été détectée pour toutes les HCVpp produites ainsi que pour trois pseudoparticules témoins (HCVpp-1a, dEnv et Ampho). Le même niveau d'expression de la capsid du MLV est observé pour toutes les pseudoparticules produites, tandis que le niveau d'expression de E2 est variable (Figure 42B), les résultats seront détaillés dans le paragraphe XX.4. E1 (31KDa) n'a pas pu être détecté pour aucune des pseudoparticules dérivée du patient 2 avec les anticorps monoclonaux H111 et A4. Ceci est probablement dû aux différences entre les séquences des variants et les épitopes ciblés par ces monoclonaux (Figure 41).

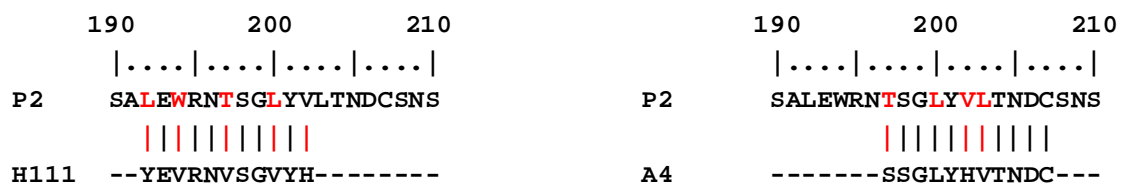


Figure 41: Alignement des séquences des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux A4 et H111 avec les séquences de la souche H77 et des variants issus de P2.

XX.4. Etude de l'entrée des différentes pseudoparticules dans des cellules Huh7

Le graphique ci-dessous (Figure 42A) montre les différentes capacités d'entrée dans des cellules Huh7 : (i) de 5 pseudoparticules portant les enveloppes de différents variants du prélèvement P2t1 , (ii) de 5 pseudoparticules portant les enveloppes de différents variants du prélèvement P2t2.

L'infectivité des pseudoparticules portant les enveloppes des variants majoritaires (P1t1c43, P2t2c6 et P2t2c34) est supérieure à celle des variants minoritaires des prélèvements correspondants. Néanmoins, notons que globalement l'infectivité des variants isolés à t2 apparaît abaissée par rapport à celle des variants isolés à t1. La capacité d'entrée est réduite de 4,6 fois pour le variant majoritaire isolé à t2, par rapport au variant majoritaire isolé à t1.

La capacité d'entrée la plus élevée dans les cellules Huh7 (mesurée en RLU) est observée pour les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire P2t1c43 (Figure 42A). Comparativement, la capacité d'entrée des 4 autres variants isolés à partir de P2t1 est réduite de 6 à 33 fois.

Pour les pseudoparticules portant les enveloppes des variants isolés au deuxième prélèvement, le plus haut niveau d'entrée est observé pour les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire P2t2c6. Comparativement, la capacité d'entrée de l'autre variant majoritaire P2t2c34 est réduit de 250 fois (Figure 42A). Aucune capacité d'entrée n'a pas été observée pour les 3 autres variants minoritaires isolés à t2, alors que la glycoprotéine E2 est correctement exprimée au niveau des pseudoparticules selon des résultats du western-blot (Figure 42B).

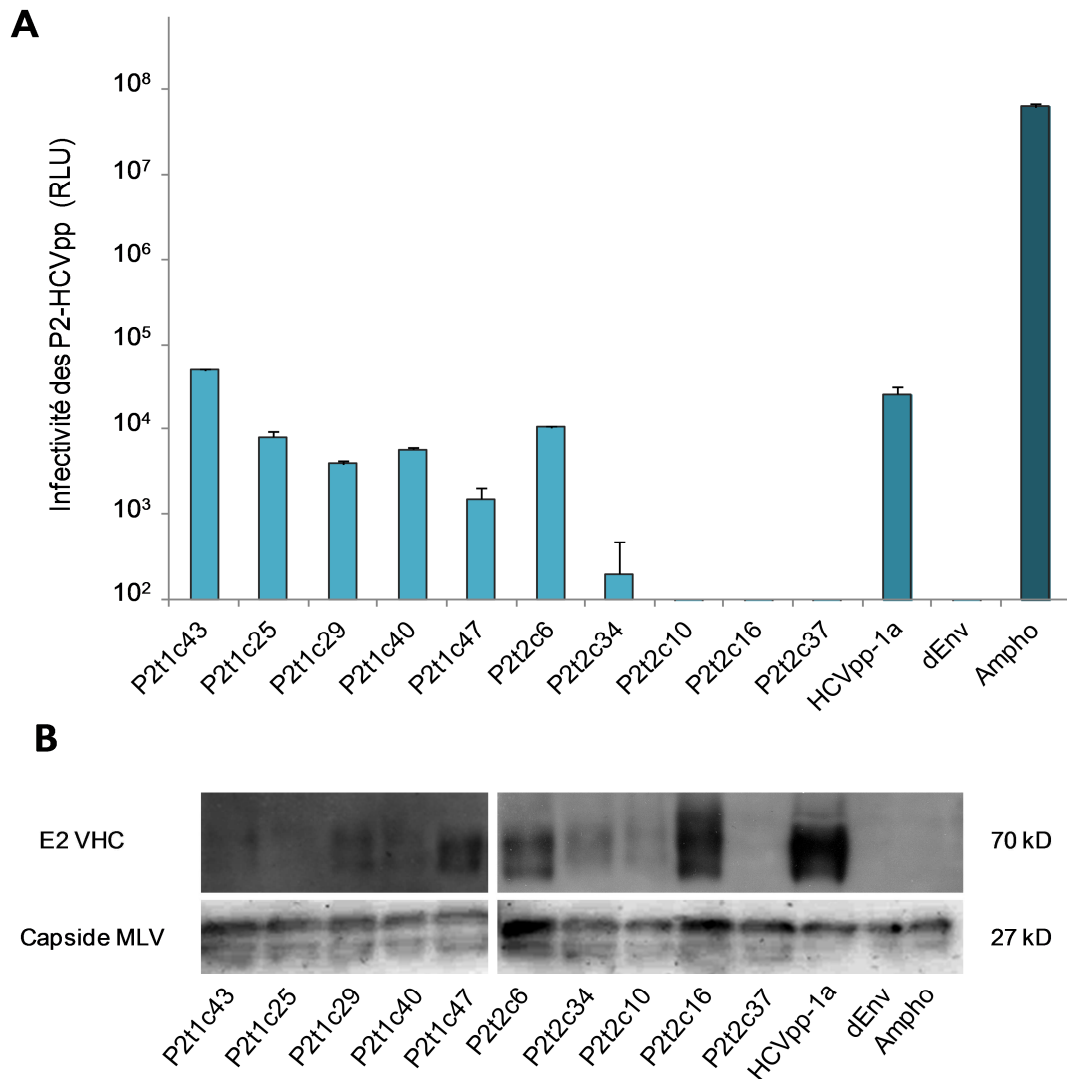


Figure 42: Capacité d'entrée des HCVpp portant les glycoprotéines E1E2 correspondants aux variants majoritaires et à des variants minoritaires isolés dans les prélèvements P2t1 et P2t2.

A Comparaison de l'infectivité des HCVpp portant dix glycoprotéines E1E2 différentes (prélèvements P2t1 et P2t2): variants majoritaires (P2t2c43 et P2t2c6 et P2t2c34) et variants minoritaires (P2t1c25, P2t1c29, P2t1c40, P2t1c47, P2t2c10, P2t2c16 et P2t2c37). Les pseudoparticules rétrovirales sans enveloppe (dEnv) ou portant l'enveloppe amphotrope du MLV ont été utilisées respectivement comme contrôle négatif et positif de l'entrée dans les cellules Huh7. Les titres infectieux ont été déduits de l'efficacité de transduction, mesurée en RLU, dans le lysat des cellules Huh7. La moyenne géométrique et les écarts-types sont calculés à partir de quatre expériences.

B Vérification par western-blot de l'expression des onze glycoprotéines d'enveloppe E2 du VHC (avec l'anticorps 3-11) et de la capside du MLV (anticorps anti-capside_{MLV}) à partir de pseudoparticules rétrovirales récupérées après filtration et ultracentrifugation du surnageant de culture des cellules 293-T transfectées.

XX.5. Réponse neutralisante autologue vis-à-vis des HCVpp portant les enveloppes des variants majoritaires

XX.5.1 Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2t1c43-HCVpp

Une activité neutralisante dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire isolée à t1 (P2t1c43), a été détectée dans tous les sérums collectés au moment du pic d'ALAT (P2t1) et pendant au moins 13 mois, exception faite pour le sérum P2t2 (Figure 43 A et B). Une neutralisation homologue est également détectée vis-à-vis de P2t1c43-HCVpp en utilisant des immunoglobulines de type G, purifiées à partir d'un mélange de sérums provenant de 3 patients infectés chroniquement par une souche de VHC de type 3 et présentant une activité anti-HVR1 positive (IgGt3).

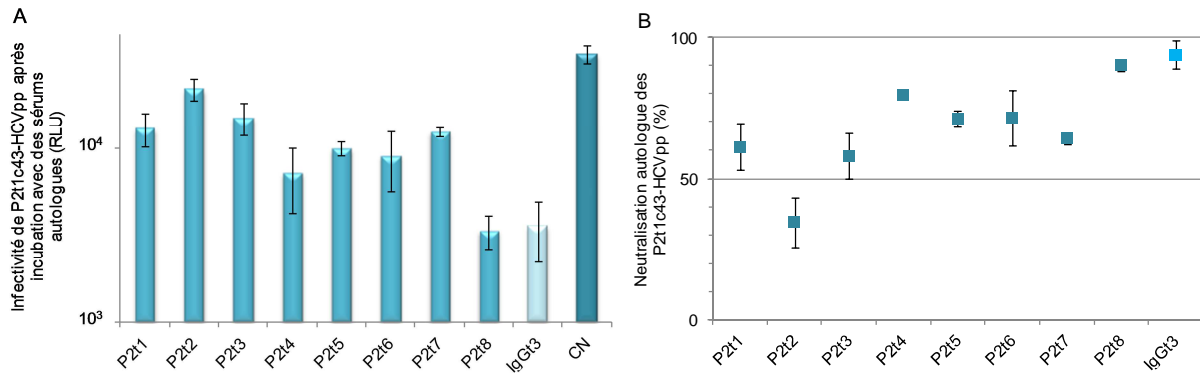


Figure 43 : Analyse au cours du temps de la réponse neutralisante autologue dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire isolé au moment du pic d'ALAT (cas du patient 2)

Les sérums ont été dilués à 1:50. L'efficacité de la transduction des cellules Huh7 est mesurée en RLU. Chaque expérience a été réalisée trois fois puis la moyenne géométrique a été calculée. IgGt3: Immunoglobulines de type G (IgG), purifiées à partir d'un mélange de sérums provenant de 3 patients infectés chroniquement par une souche de VHC de type 3 et présentant une activité anti-HVR1 positive, selon les résultats d'un immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics). La concentration en IgG a été fixée à 0.268 g/L de façon identique à la concentration mesurée dans les sérums du patient, dilués au 1/50. Le sérum témoin (CN) est un mélange de 100 sérums de donneurs de sang pour lesquels la détection des Ac anti-VHC et de l'ARN du VHC sont négatifs.

Dans la Figure 44 A, sont présentés les résultats des expériences de transduction des cellules Huh7 avec les pseudoparticules portant l'enveloppe du variant majoritaire P2T1c43, préalablement incubées avec les sérums séquentiels (de A à H) à différentes dilutions (1/25, 1/50, 1/100, 1/200 et 1/400). Le pourcentage de neutralisation est présenté pour chaque dilution de sérum, en comparant l'infektivité de la pseudoparticule en présence du sérum à une dilution donnée par rapport à l'infektivité en présence du sérum témoin à la même dilution (Figure 44 B).

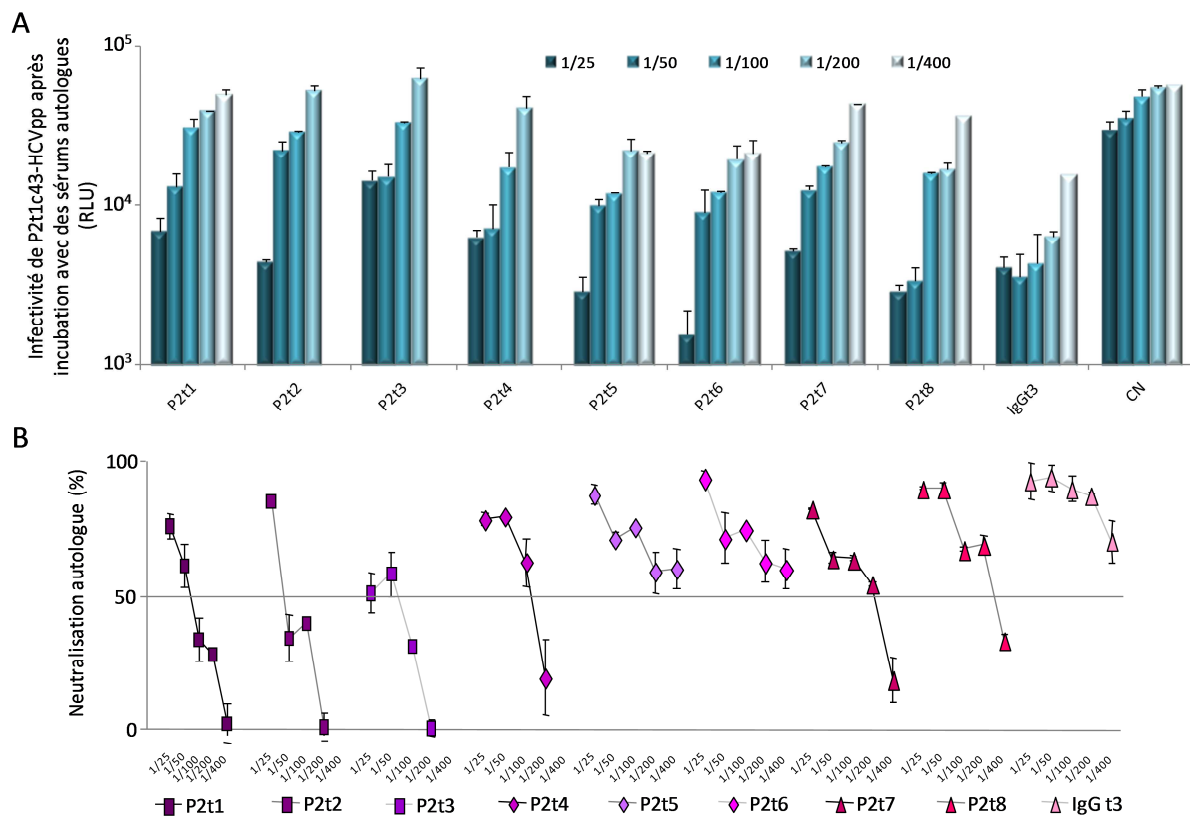


Figure 44 : Analyse de la réponse de neutralisation autologue contre la pseudoparticule portant l'enveloppe du variant majoritaire P2t1c43.

IgGt3: Immunoglobulines de type G (IgG), purifiées à partir d'un mélange de sérums provenant de 3 patients infectés chroniquement par une souche de VHC de type 3 et présentant une activité anti-HVR1 positive, selon les résultats d'un immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics). Le sérum témoin (CN) est un mélange de 100 sérums de donneurs de sang pour lesquels la détection des Ac anti-VHC et de l'ARN du VHC sont négatifs.

Les expériences de titrage de la réponse neutralisante montre une augmentation progressive au fil du temps de la DI_{50} avec un maximum obtenu entre 5 et 6 mois après le pic d'ALAT: 80 (P2t1), 47 (P2t2), 126 (P2t3), 140 (P2t4), > 400 (P2t5), > 400 (P2t6), 253 (P2t7) et 306 (P2t8).

XX.5.2 Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2T2c6-HCVpp

Nous avons décrit précédemment que l'infectivité de la pseudoparticule portant l'enveloppe de l'un des variants majoritaires isolée à t2 (P2t2c34) était considérablement réduite (de 250 fois) par rapport à celle de l'autre variant majoritaire (P2t2c6) (Figure 42). Par conséquent, nous avons focalisé l'étude de l'activité neutralisante autologue vis-à-vis de P2t2c6-HCVpp.

La réponse neutralisante autologue n'a pas été détectée précocement entre P2t1 et P2t3 (Figure 46). Nous observons une absence de neutralisation vis-à-vis de la pseudoparticule P2t2c6-HCVpp en présence du sérum contemporain (P2t2). Elle est détectable (>50%) uniquement en présence du sérum P2t4 (3 mois après le pic d'ALAT).

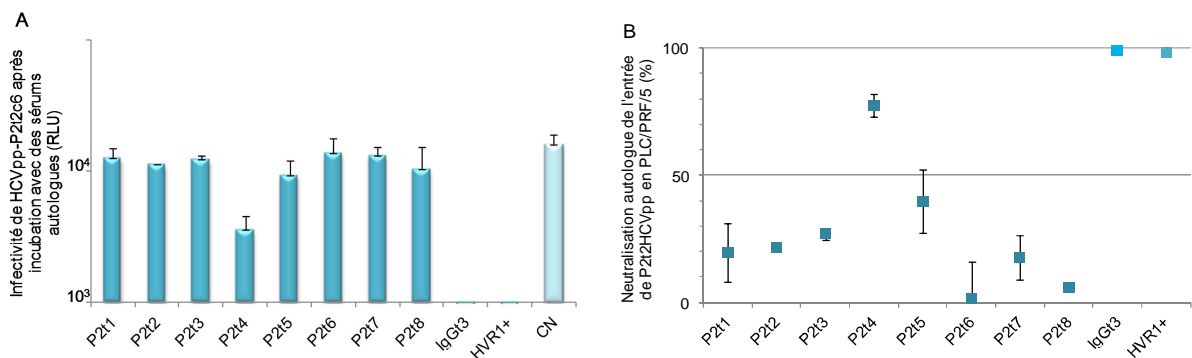


Figure 45 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe d'un des variants majoritaires isolée dans le prélèvement P2t2.

Ces expériences de neutralisation ont été réalisées en triple avec 8 sérums (P2t1 à P2t8) dilués au 1/50. **A,** L'infectivité a été calculée en réalisant une moyenne géométrique. Les sérums ont été dilués au 1:50 et les résultats des expériences de transduction sont exprimés en RLU. IgG g3: mélange de sérums à partir de 3 patients infectés par le VHC de type 3; HVR1 +: mélange de 3 sérums avec des anticorps anti HVR1. **B,** Réponse neutralisante autologue séquentielle dirigée contre des HCVpp portant l'enveloppe d'un variant majoritaire isolée à 17 jours après le pic d'ALAT (P2t2c6).

XX.5.3 Réponse neutralisante vis-à-vis de la pseudoparticule P2T2c6-HCVpp

Nous avons décrit précédemment que l'infektivité de la pseudoparticule portant l'enveloppe de l'un des variants majoritaires isolée à t2 (P2t2c34) était considérablement réduite (de 250 fois) par rapport à celle de l'autre variant majoritaire (P2t2c6) (Figure 42). Par conséquent, nous avons focalisé l'étude de l'activité neutralisante autologue vis-à-vis de P2t2c6-HCVpp.

La réponse neutralisante autologue n'a pas été détectée précocement entre P2t1 et P2t3 (Figure 46). Nous observons une absence de neutralisation vis-à-vis de la pseudoparticule P2t2c6-HCVpp en présence du sérum contemporain (P2t2). Elle est détectable (>50%) uniquement en présence du sérum P2t4 (3 mois après le pic d'ALAT).

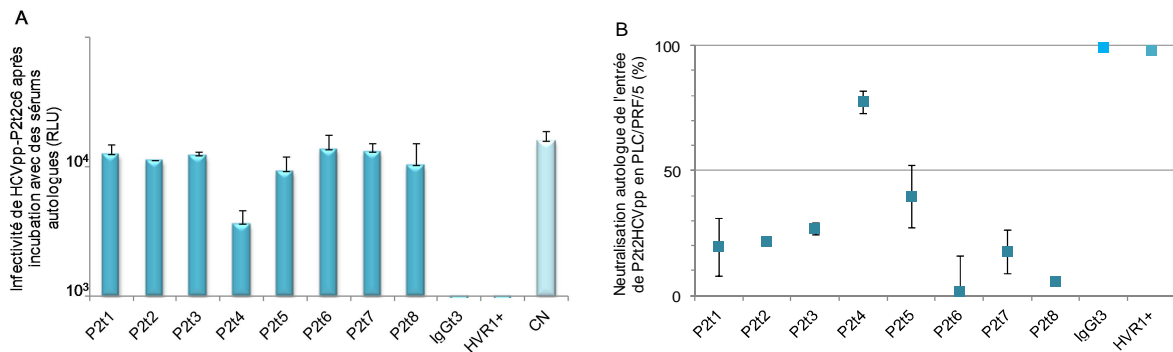


Figure 46 : Analyse de la réponse neutralisante autologue au cours du temps dirigée contre les HCVpp portant l'enveloppe d'un des variants majoritaires isolée dans le prélèvement P2t2.

Ces expériences de neutralisation ont été réalisées en triple avec 8 sérums (P2t1 à P2t8) dilués au 1/50.

A, L'infektivité a été calculée en réalisant une moyenne géométrique. Les sérums ont été dilués au 1:50 et les résultats des expériences de transduction sont exprimés en RLU. IgG g3: mélange de sérums à partir de 3 patients infectés par le VHC de type 3; HVR1 +: mélange de 3 sérums avec des anticorps anti HVR1. **B,** Réponse neutralisante autologue séquentielle dirigée contre des HCVpp portant l'enveloppe d'un variant majoritaire isolée à 17 jours après le pic d'ALAT (P2t2c6).

DISCUSSION

L'analyse de l'évolution génétique du VHC en association avec la réponse humorale de l'hôte est essentielle pour une meilleure compréhension de l'histoire naturelle du VHC. Elle apporte des éclairages sur les mécanismes menant à la guérison spontanée chez une minorité de patients. Les anticorps neutralisants seraient des acteurs clés dans la défense de l'hôte. *In vivo*, la variabilité de leurs cibles, que sont glycoprotéines d'enveloppe, est en partie à l'origine de l'échappement immunitaire. L'exploration de la réponse neutralisante autologue, prenant en compte la dynamique des variants viraux est la plus pertinente dans ce contexte.

Diversité et dynamique des variants viraux, relation avec l'infectivité sur des cellules cibles (cas du patient 2)

Une exploration détaillée de l'évolution des quasi-espèces au cours des étapes très précoces de la guérison spontanée a pu être réalisée pour le patient P2 suite au succès de l'amplification génique des glycoprotéines E1E2 à partir de deux échantillons de sérums séquentiels prélevés à 17 jours d'intervalle. Ce phénomène rapide de dérive génétique très rapide a été confirmé par la valeur élevée de l'indice de Wright ($F_{ST} = 0.65$; $p < 0.001$) montrant qu'il existe une différenciation génétique significative entre les variants isolés aux deux temps.

L'analyse de la diversité des glycoprotéines E1E2 a porté sur un total de 80 clones (41 à t1 et 39 à t2, numéro d'accèsion JQ285738-JQ285848). Chez le patient 2, le variant majoritaire identifié à t1 (P2t1c43, fréquence 12/41) n'a pas été détecté à t2 (17 jours plus tard) parmi 39 clones. Un variant minoritaire identifié à t1 (P2t1c26, 2/41), a rapidement émergé à t2, représentant 6 clones sur 39 (P2t2c6), devenant ainsi un des deux variants majoritaires. P2t2c6 présente quatre mutations par rapport au variant majoritaire à t1 (V₂₅₇I, R₂₅₉S, T₃₀₃A, K₅₂₂R). L'autre variant majoritaire à t2 (P2t2c34, 7/39) présente une mutation supplémentaire dans le peptide signal de la capsid (S₁₇₂P) (**Tableau 26**). Notons que ces cinq événements mutationnels apparaissent à l'extérieur de HVR1. Il est également important de signaler que les sites soumis à pression de sélection positive ne sont pas localisés dans HVR1 (**Figure 39**), confirmant que dans ce cas précis, la pression de sélection serait exercée à l'extérieur de ce domaine. Nous avons montré qu'un site situé dans HVR3 est soumis à une forte pression de sélection positive. Au contraire, dans les trois cas de clairance tardive étudiés par Dowd *et al.*, 5, 9 et 6 changements en aa étaient détectés dans HVR1, respectivement 16, 8 et 9 mois après la détection initiale de la virémie (Dowd et al. 2009)

alors que seulement 4, 1 et 2 changements étaient répertoriés en dehors de HVR1. À titre comparatif, nous montrons dans un intervalle temps beaucoup plus court (17 jours) que 4 et 5 mutations se sont déjà accumulées entre les variants majoritaires identifiés à t1 et t2.

Cette évolution rapide de la séquence a été suivie d'une réduction de l'inféctivité du variant majoritaire à t2 (P2t2c6) par rapport au variant majoritaire à t1 (P2t2c43). Les variants mineurs à t2 (P2t2c10, c16, c37) ont perdu la capacité d'entrée ($<2\log$ RLU) (**Figure 42A**). L'entrée de P2t2c37 est abolie en raison la mutation T₄₂₄A situé dans l'une des zones proposées comme domaine de la protéine de fusion (Flint et al.1999; Pérez-Berna et al. 2006; Lavillette et al. 2007; Drummer et al. 2007; Russell et al. 2009; Li et al. 2009; Krey et al. 2010). Même observation pour P2t2c16 portant une mutation en position 496, située deux aa en amont d'une zone impliquée dans la liaison aux récepteurs CD81 (Zhang et al. 2004; Mike Flint et al.1999). La capacité d'entrée de P2t2c10 est probablement abolie par une mutation au niveau E2N9 (S₅₈₂P) située dans la région variable intergénomique (IgVR), décrite comme ayant une influence sur la capacité d'entrée.(McCaffrey et al. 2011)

Les HCVpp portant les enveloppes des variants mineurs isolés à t1 (P2t1c25, c47, c40, c29) ont une capacité diminuée de l'entrée par rapport au variant majoritaire (**Figure 42A**):

-P2t1c25 porte une mutation unique à la position 522 (K> R), en comparaison avec le variant P2t1c43, situé dans une zone de E2 impliquée dans la liaison au récepteur CD81 (Flint et al. 1999; Zhang et al. 2004) et à proximité d'une zone jouant un rôle dans le processus de fusion (aa 502 - 520) (Lavillette et al. 2007).

-P2t1c47 possède une seule substitution sur E1 (T₃₀₃A) qui n'a pas été décrite jusqu'alors comme ayant un impact sur l'entrée du VHC.

- P2t1c29 a deux mutations supplémentaires situées dans E1 (V₂₅₇I et R₂₅₉S), en comparaison avec P2t1c47. Dans la littérature, ces deux substitutions n'ont pas été décrites comme ayant un impact sur la modulation de l'entrée du VHC.

- P2t1c40 portant la substitution T₅₃₄A, situé dans E2N6 en plus de deux mutations citées précédemment (V₂₅₇I, R₂₅₉S). La réduction de la capacité d'entrée de ce variant a été également décrite dans un autre travail utilisant le modèle des HCVpp (Falkowska et al. 2007).

Nous avons observé que les 4 mutations précédemment citées réduisent la capacité d'entrée. Nous envisageons de confirmer la validité de ces résultats avec le modèle HCVcc.

Identification *in vivo* d'un variant muté sur le site E2N11 (Cas du patient 1)

Contrairement au patient P2, la diversité génétique a pu être étudiée à partir d'un seul sérum, prélevé 17 jours après le pic d'ALAT. Nous avons réalisé une étude détaillée de la distribution des sites potentiels de N-glycosylation. Neuf sites de glycosylation (E1N1, E1N2, E1N3, E1N4, E2N6, E2N7, E2N8, E2N9 et E2N10) ont été identifiés pour les 33 clones. Ces sites correspondent à ceux décrits dans la littérature pour le génotype 1b. Il n'est pas surprenant que le site E2N5₄₇₆ soit absent en raison de sa basse fréquence d'apparition dans le génotype 1b (17%) (Helle et al. 2007).

Le site E2N11 apparaît quant à lui très conservé pour les 33 clones séquencés, exception faite pour le clone 28 (c28) possédant la substitution N₆₄₅S. A notre connaissance, l'existence *in vivo* d'un tel mutant n'a pas été décrite dans la littérature.

Les HCVpp portant l'enveloppe du variant d'origine (P1t2c28) ainsi que le mutant (P1t1c16-N645S) ont une capacité réduite d'entrée c.à.d. 2 et 2,5 fois moins que les HCVpp portant l'enveloppe du variant majoritaire (P1t2c16) (Figure 33). Deux autres travaux publiés ont également montré une diminution de la capacité d'entrée liée à une mutation sur ce site mais de nature différente (N>Q ou N>A) (Goffard et al. 2005; Falkowska et al. 2007). Dans nos expériences de mutagenèse dirigée, la substitution d'une sérine par une asparagine à cette position a permis de rétablir le site de glycosylation E2N11 Tableau 22. Cette restauration permet de ramener l'infectivité de la particule au même niveau que celle du variant majoritaire, suggérant l'implication de la glycosylation sur le site E2N11 dans les mécanismes d'entrée du VHC. Falkowska *et al.* ont suggéré que la substitution d'une asparagine (acide aminé polaire) par une alanine (acide aminé apolaire) a un effet important sur le repliement des glycoprotéines E1E2 (Falkowska et al. 2007). Selon nos résultats, l'expression des glycoprotéines E1E2 de ce mutant (N₆₄₅S) n'est pas affecté par rapport au variant majoritaire (Figure 33B). C'est également le cas pour le mutant (N₆₄₅Q) étudié par Goffard *et al.* (Goffard et al. 2005). Dans nos expériences et dans les travaux cités ci-dessus, les substitutions n'affectent pas les propriétés polaires. Ceci suggère que la conservation des propriétés physico-chimiques sur le site 645 est primordiale pour une bonne conformation de E1E2.

En l'absence du site E2N11, P1t2c28 a pu être neutralisé par 3 sur 6 sérums autologues Figure 35. Les résultats de Helle *et al.* montrent que l'absence du site E2N11 est responsable d'une augmentation de la sensibilité à la neutralisation vis-à-vis d'anticorps homologues ou des monoclonaux anti-E2. L'hypothèse d'un rôle protecteur vis-à-vis de la neutralisation de E2N11 a été évoqué dans ce dernier travail : ce site réduirait l'accès de E2 au

CD81 (Helle et al. 2007). Dans nos travaux, il n'a pas été noté d'augmentation notable de la sensibilité de ce mutant à la neutralisation vis-à-vis du variant majoritaire (Figure 34 et Figure 35). Néanmoins, nous n'avons pas pu réaliser de titrage des anticorps neutralisants faute de disponibilité du matériel génétique. Signalons également que la sensibilité aux anticorps a été testée vis-à-vis des variants de nature différente : l'un minoritaire, l'autre majoritaire, cible probablement privilégiée de la réponse humorale,

Etude de la réponse neutralisante autologue

En raison de la grande hétérogénéité génétique des enveloppes du VHC, l'utilisation de pseudoparticules portant des enveloppes hétérologues peut biaiser les conclusions concernant l'étude de la réponse neutralisante. Dans divers travaux, une réponse neutralisante hétérologue a été détectée aussi bien au moment de l'hépatite C aiguë que lors de l'hépatite C chronique (Bartosch et al. 2003; Logvinoff et al. 2004; Netski et al. 2005; Meunier et al. 2005). De plus, il a été décrit que la réponse neutralisante dirigée contre des HCVpp autologues était plus sensible que celle dirigée contre des HCVpp hétérologues. (Dowd et al 2009).

L'originalité de notre travail repose sur l'analyse détaillée de deux cas de guérison spontanée très rapide lors d'une infection par le VHC. Dans ces deux cas, la période de clairance a été bien définie : entre 17 et 54 jours après le pic d'ALAT pour le patient P1 et entre 48 et 83 jours pour le patient P2. Par conséquent, nous avons pu définir clairement qu'il s'agissait d'une élimination spontanée très rapide du VHC. A notre connaissance, c'est la première étude analysant la dynamique des variants viraux précoces en association avec la réponse neutralisante autologue lors d'une guérison spontanée rapide chez un patient infecté par une souche du VHC de type 3a. Dowd *et al.* ont réalisé un travail sur la même thématique mais il s'agissait de patients infectés par des souches de génotype 1. Pour les trois cas de guérison spontanée décrits, la virémie s'était négativée tardivement, c.à.d. entre 15 et 19 mois (Dowd et al. 2009).

L'étude de la réponse neutralisante autologue est limitée par la disponibilité d'échantillons biologiques provenant de patients suivis depuis les étapes précoces de la primo-infection et non traités. L'évolution de la réponse neutralisante autologue en parallèle avec la dynamique des populations virales a pu être explorée dans de rares travaux, comme celui mené par Von Hahn *et al.* chez un patient porteur chronique suivi pendant 26 ans (von Hahn et al. 2006). Dans le cas du VIH-1, les travaux portant sur la réponse autologue ont précisé un certain nombre de concepts sur les mécanismes d'échappement du virus à la

neutralisation (Richman et al. 2003; Wei et al. 2003). Cette réponse était inefficace sur les variants contemporains. Différents auteurs ont décrit des variants d'échappement précoces présentant une redistribution des sites potentiels de N-glycosylation (Wei et al. 2003; Dacheux et al. 2004; Sagar et al. 2006; Bunnik et al. 2008; Chaillon et al. 2011). Des mécanismes d'échappement analogues pourraient contribuer à l'établissement d'une infection persistante par le VHC (von Hahn et al. 2007). Même si les sites de glycosylation apparaissent plus conservés que pour le VIH-1 (Helle et al. 2007), les propriétés modulatrices de certains glycanes situés sur les glycoprotéines d'enveloppe (E2N1, E2N6, E2N11) vis-à-vis de la neutralisation, ont pu être démontrés, mêmes si ces constatations restent à vérifier *in vivo*.

Dans le cas du patient 1, l'intensité de la neutralisation autologue était la plus élevée au moment de la clairance c.a.d. entre 17 et 54 jours après le pic d'ALAT. Néanmoins, il s'agit d'une interprétation de la valeur du pourcentage de neutralisation (à la dilution 1/50) et non d'un titrage mesurant l'activité neutralisante des sérums séquentiels. Dans le travail de Dowd et al., la réponse autologue était forte vis-à-vis des variants précoces au moment de l'élimination virale mais il s'agissait dans ces trois cas-là d'une négativation tardive de la virémie, au-delà de un an. Elle était absente voire faible aux phases précoces chez trois patients ayant évolué vers la chronicité (Dowd et al. 2009).

Dans le cas du patient P2, le variant majoritaire P2t1c43 n'a pas été trouvé 17 jours plus tard dans l'échantillon P2t2, avec les limites inhérentes au clonage. Notons que la réponse neutralisante contre cette pseudoparticule était déjà détectable (> 50%) à cette étape très précoce (t1) (Figure 44), suggérant l'efficacité de ces anticorps autologues pour neutraliser ce variant et le rendre indétectable dans le sang périphérique. A ce stade, les anticorps autologues étaient absents contre le variant émergeant P2t2c6, mais étaient détectables 83 jours après le pic d'ALAT. Cet échec initial de la réponse neutralisante autologue pourrait probablement expliquer l'émergence de P2t2c6, qui était un clone minoritaire à t1 (variants P2t1c4 et P2t1c26, fréquence 2/41). La guérison spontanée s'est produite entre le 48^{ème} et le 83^{ème} jour, conjointement au développement de la réponse neutralisante autologue (>80% à t4).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a montré que la guérison spontanée rapide d'une infection par le VHC s'accompagnait d'une réponse neutralisante autologue d'apparition très précoce. Conjointement à cette défense de l'hôte, nous avons observé *in vitro* une réduction très importante de l'infectivité des variants aux étapes précoces de l'infection par le VHC. Ce sont deux éléments contributifs à l'éradication virale. Mais, nous sommes conscients que nos conclusions sont limitées à l'exploitation de deux cas. Il faudrait renouveler ces observations en explorant de la même manière des cas supplémentaires. De plus, il aurait été pertinent d'examiner parallèlement l'efficacité et l'intensité de la réponse à médiation cellulaire et de déterminer les polymorphismes génétiques pouvant influencer l'évolution de l'infection par le VHC. Mais, notre travail étant rétrospectif, nous ne disposons pas du matériel biologique adapté.

La persistance de la réponse neutralisante autologue au-delà de l'éradication du VHC est un résultat très important de ce travail, qui soulève une interrogation : Quel rôle ces anticorps joue-t-il en cas de réinfection ? Ceci pourrait être réalisé, si nous avions à disposition une cohorte de patients toxicomanes, population très exposée au risque de réinfection. Il faudrait au préalable authentifier sur le plan moléculaire la réalité de la réinfection chez les patients étudiés.

Nos explorations moléculaires ont révélé qu'une différenciation génétique pouvait se produire très précocement en début d'infection (cas N°2). Les résultats ont été obtenus après analyse des variants identifiés avec des techniques de clonage. Même si le nombre de clones étaient déjà conséquent, il serait pertinent de confirmer nos observations sur d'autres cas de guérison rapide avec une méthode fournissant une meilleure représentativité de la population virale, comme par exemple la PCR en dilution limite (Single Genomic Amplification). Par ailleurs, nous envisageons d'étudier avec cette méthodologie les mécanismes de diversification du VHC lors des événements de transmission. Le modèle choisi est la transmission mère-enfant : nous avons l'opportunité grâce à une collaboration avec une équipe Thaïlandaise de disposer de sérums provenant d'une dizaine de couples mère-enfant, l'enfant ayant été contaminé par voie materno-fœtale. Nous nous attacherons à déterminer les caractéristiques moléculaires des variants transmis et à en étudier les propriétés fonctionnelles, en particulier l'infectivité et la sensibilité aux anticorps neutralisants maternels.

Nous avons porté une attention particulière à un variant minoritaire muté sur un site de glycosylation (E2N11) théoriquement très conservé. Nous confortons avec nos résultats

l'hypothèse déjà évoquée dans la littérature d'un rôle modulateur de ce site sur la sensibilité à la neutralisation. Mais, ces expérimentations ont été réalisées en utilisant des sérums hétérologues ou des anticorps monoclonaux. Nous souhaiterions vérifier nos observations préliminaires en étudiant l'impact du maintien ou de l'abolition de ce site. Pour cela, nous sélectionnerons des prélèvements sériques issus de 5 à 10 patients porteurs chroniques du VHC non traités. Le variant majoritaire de la « quasi-espèce » circulant chez chacun de ces patients sera identifié. Le site E2N11 de chaque variant, s'il est présent, sera aboli par des expériences de mutagenèse dirigée. Des pseudoparticules rétrovirales portant les enveloppes sauvages et mutées seront produites. Nous comparerons la capacité des variants sauvages et mutés à être neutralisés par les sérums autologues. Nous suivrons ensuite la même méthodologie pour étudier le rôle des sites E2N6 et E2N1, décrits comme protégeant des phénomènes de neutralisation *in vitro*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acton, S. et al., 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271(5248), p.518-520.
- Agnello, V. et al., 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), p.12766-12771.
- Agnello, V. & Abel, G., 1997. Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. *Arthritis and Rheumatism*, 40(11), p.2007-2015.
- Ahmad, W. et al., 2011. Claudin-1 required for HCV virus entry has high potential for phosphorylation and O-glycosylation. *Virology Journal*, 8, p.229.
- Ai, L.-S., Lee, Y.-W. & Chen, S.S.-L., 2009. Characterization of hepatitis C virus core protein multimerization and membrane envelopment: revelation of a cascade of core-membrane interactions. *Journal of Virology*, 83(19), p.9923-9939.
- Albecka, A. et al., 2010. Identification of New Functional Regions in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology*, 85, p.1777-1792.
- Alexopoulou, L. et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), p.732-738.
- Alter, H J et al., 1978. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 1(8062), p.459-463.
- Andre, P. et al., 2002. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *Journal of Virology*, 76(14), p.6919-6928.
- Andréo, U. et al., 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cellular Microbiology*, 9(10), p.2445-2456.
- Appel, N. et al., 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathogens*, 4(3), p.e1000035.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, Ralf, 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of Virology*, 79(5), p.3187-3194.
- Arnaud, N. et al., 2011. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathogens*, 7(10), p.e1002289.
- Ascione, A., Tartaglione, T. & Di Costanzo, G.G., 2007. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Digestive and Liver disease*, 39 Suppl 1, p.S4-7.

- Bain, C. et al., 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 78(19), p.10460-10469.
- Bankwitz, D. et al., 2010. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of Virology*, 84(11), p.5751-5763.
- Baranova, I.N. et al., 2005. Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), p.8031-8040.
- Barba, G. et al., 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), p.1200-1205.
- Bartenschlager, R et al., 1995. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of Virology*, 69(12), p.7519-7528.
- Bartenschlager, Ralf, Frese, M. & Pietschmann, T., 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in virus research*, 63, p.71-180.
- Barth, H. et al., 2011. Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology*, 54(4), p.1135-1148.
- Barth, H. et al., 2003a. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), p.41003 -41012.
- Barth, H. et al., 2003b. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), p.41003 -41012.
- Barth, H. et al., 2006. Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *Journal of Virology*, 80(21), p.10579-10590.
- Bartosch, B. et al., 2003. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), p.14199.
- Bartosch, Birke et al., 2005. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 79(13), p.8217-8229.
- Bartosch, Birke, Vitelli, A., et al., 2003. Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), p.41624 -41630.

- Bartosch, Birke, Dubuisson, Jean & Cosset, François-Loïc, 2003. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(5), p.633 -642.
- Bashirova, A.A. et al., 2001. A Dendritic Cell–Specific Intercellular Adhesion Molecule 3–Grabbing Nonintegrin (Dc-Sign)–Related Protein Is Highly Expressed on Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Promotes HIV-1 Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(6), p.671 -678.
- Bassett, S.E., Brasky, K.M. & Lanford, R E, 1998. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *Journal of Virology*, 72(4), p.2589-2599.
- Basu, Arnab et al., 2007. Sulfated Homologues of Heparin Inhibit Hepatitis C Virus Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 81(8), p.3933-3941.
- Baumert, Thomas F. et al., 1998. Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *Journal of Virology*, 72(5), p.3827-3836.
- Benedicto, I. et al., 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology*, 48(4), p.1044-1053.
- Benga, W.J.A. et al., 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*, 51(1), p.43-53.
- Bhattacharya, D. et al., 2011. Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virology Journal*, 8, p.458.
- Bigger, C.B., Brasky, K.M. & Lanford, R E, 2001. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 75(15), p.7059-7066.
- Blanchard, E. et al., 2006. Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, 80(14), p.6964 -6972.
- Booth, J.C. et al., 1998. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology*, 27(1), p.223–227.
- Boson, B. et al., 2011. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathogens*, 7(7), p.e1002144.
- Boulant, S. et al., 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), p.22236-22247.
- Boulestin, A. et al., 2002. Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon-alpha. *Journal of Medical Virology*, 68(2), p.221-228.

- Bowen, D.G. & Walker, Christopher M., 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, 436(7053), p.946-952.
- Bradley, D. et al., 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *Journal of Medical Virology*, 34(3), p.206-208.
- Brass, V. et al., 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), p.8130-8139.
- Brimacombe, C.L. et al., 2011. Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of Virology*, 85(1), p.596-605.
- Broering, T.J. et al., 2009. Identification and Characterization of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies Directed against the E2 Envelope Glycoprotein of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 83(23), p.12473-12482.
- Bukh, Jens, 2004. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology*, 39(6), p.1469-1475.
- Bukh, Jens, 2012. Animal Models for the Study of Hepatitis C Virus Infection and Related Liver Disease. *Gastroenterology*, 142(6), p.1279-1287.e3.
- Bunnik, E.M. et al., 2008. Autologous Neutralizing Humoral Immunity and Evolution of the Viral Envelope in the Course of Subtype B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, 82(16), p.7932-7941.
- But, D.-Y.-K., Lai, C.-L. & Yuen, M.-F., 2008. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 14(11), p.1652-1656.
- Cai, L. et al., 2005. Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), p.2954-2961.
- Cai, Z. et al., 2007. Human serum amyloid A protein inhibits hepatitis C virus entry into cells. *Journal of Virology*, 81(11), p.6128-6133.
- Callens, N. et al., 2005. Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry. *Journal of Virology*, 79(24), p.15331-15341.
- Carrère-Kremer, S. et al., 2004. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), p.41384-41392.
- Carrère-Kremer, S. et al., 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 76(8), p.3720-3730.
- Catanese, M.T. et al., 2007. High-Avidity Monoclonal Antibodies against the Human Scavenger Class B Type I Receptor Efficiently Block Hepatitis C Virus Infection in the Presence of High-Density Lipoprotein. *Journal of Virology*, 81(15), p.8063-8071.

- Chaillon, A. et al., 2011. The V1V2 domain and an N-linked glycosylation site in the V3 loop of the HIV-1 envelope glycoprotein modulate neutralization sensitivity to the human broadly neutralizing antibody 2G12. *Journal of Virology*, 85(7), p.3642-3648.
- Chandran, K. et al., 2005. Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. *Science*, 308(5728), p.1643 -1645.
- Chang, K.-S. et al., 2007. Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Journal of Virology*, 81(24), p.13783-13793.
- Chayama, K et al., 2000. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology*, 32(5), p.1138-1144.
- Chen, Y et al., 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, 3(8), p.866-871.
- Chisari, Francis V., 2005. Unscrambling hepatitis C virus host interactions. *Nature*, 436(7053), p.930-932.
- Choukhi, Amelie et al., 1998. Involvement of Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Folding of Hepatitis C Virus Glycoproteins. *Journal of Virology*, 72(5), p.3851-3858.
- Ciczora, Y. et al., 2005. Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *Journal of General Virology*, 86(10), p.2793 -2798.
- Ciczora, Y. et al., 2007. Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins: Residues Involved in E1E2 Heterodimerization and Involvement of These Domains in Virus Entry. *Journal of Virology*, 81(5), p.2372-2381.
- Clayton, Reginald F et al., 2002. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *Journal of virology*, 76(15), p.7672-7682.
- Cocquerel, Laurence et al., 1998. A Retention Signal Necessary and Sufficient for Endoplasmic Reticulum Localization Maps to the Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *Journal of Virology*, 72(3), p.2183-2191.
- Cocquerel, Laurence et al., 2000. Charged Residues in the Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Glycoproteins Play a Major Role in the Processing, Subcellular Localization, and Assembly of These Envelope Proteins. *Journal of Virology*, 74(8), p.3623-3633.
- Cocquerel, Laurence et al., 2001. Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2. *Journal of General Virology*, 82(7), p.1629 -1635.
- Cocquerel, Laurence et al., 2003. Recognition of Native Hepatitis C Virus E1E2 Heterodimers by a Human Monoclonal Antibody. *Journal of Virology*, 77(2), p.1604-1609.

- Cocquerel, Laurence et al., 1999. The Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Is a Signal for Static Retention in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology*, 73(4), p.2641-2649.
- Cocquerel, Laurence, Voisset, Cécile & Dubuisson, Jean, 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *Journal of General Virology*, 87(5), p.1075 -1084.
- Colina, R. et al., 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 85(1), p.31-37.
- Conrad, M.E. & Lemon, S M, 1987. Prevention of endemic icteric viral hepatitis by administration of immune serum gamma globulin. *Journal of Infectious Diseases*, 156(1), p.56-63.
- Cooper, S et al., 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 10(4), p.439-449.
- Coppola, N. et al., 2009. Improvement in the aetiological diagnosis of acute hepatitis C: a diagnostic protocol based on the anti-HCV-IgM titre and IgG Avidity Index. *Journal of Clinical Virology*, 46(3), p.222-229.
- Cormier, E.G., Tsamis, Fay, et al., 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), p.7270-7274.
- Cormier, E.G., Durso, R.J., et al., 2004. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), p.14067 -14072.
- Cox, A.L. et al., 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology*, 42(1), p.104–112.
- Cribier, B. et al., 1998. Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Archives of Virology*, 143(2), p.375-379.
- Cristina, J. & Colina, R., 2006. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Virology Journal*, 3(1), p.53.
- Crotta, S. et al., 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *Journal of Experimental Medicine*, 195(1), p.35-41.
- Dacheux, L. et al., 2004. Evolutionary Dynamics of the Glycan Shield of the Human Immunodeficiency Virus Envelope during Natural Infection and Implications for Exposure of the 2G12 Epitope. *Journal of Virology*, 78(22), p.12625-12637.
- David, X.R. et al., 1995. [Familial transmission of hepatitis C virus]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 19(2), p.150-155.
- Day, C.L. et al., 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 76(24), p.12584-12595.

- Deleersnyder, V. et al., 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology*, 71(1), p.697-704.
- Delgrange, D. et al., 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *Journal of General Virology*, 88(9), p.2495 -2503.
- Delport, W. et al., 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, 26(19), p.2455 -2457.
- Demetriou, V.L., Kyriakou, E. & Kostrikis, L.G., 2011. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Advances in virology*, 2011, p.710438.
- Dhillon, S. et al., 2010. Mutations within a Conserved Region of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein That Influence Virus-Receptor Interactions and Sensitivity to Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 84(11), p.5494-5507.
- Diepolder, H M et al., 1997. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 71(8), p.6011-6019.
- Diepolder, H M et al., 1996. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. *Journal of Molecular Medicine*, 74(10), p.583-588.
- Domingo, E. & Holland, J.J., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*, 51, p.151-178.
- Dowd, K.A. et al., 2009. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 136(7), p.2377-2386.
- Dreux, Marlène et al., 2006. High Density Lipoprotein Inhibits Hepatitis C Virus-neutralizing Antibodies by Stimulating Cell Entry via Activation of the Scavenger Receptor BI. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), p.18285 -18295.
- Drummer, H.E. et al., 2006. A Conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr Motif in Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Is a Determinant of CD81 Binding and Viral Entry. *Journal of Virology*, 80(16), p.7844-7853.
- Drummer, H.E., Boo, I. & Pountourios, P., 2007. Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *Journal of General Virology*, 88(4), p.1144 -1148.
- Drummer, H.E., Maerz, A. & Pountourios, P., 2003. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Letters*, 546(2-3), p.385-390.
- Drummer, H.E. & Pountourios, P., 2004. Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Contains a Membrane-proximal Heptad Repeat Sequence That Is Essential for E1E2 Glycoprotein Heterodimerization and Viral Entry. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), p.30066 -30072.

- Du, H. et al., 2012. Complex patterns of HCV epidemic in Suzhou: evidence for dual infection and HCV recombination in East China. *Journal of clinical virology*, 54(3), p.207-212.
- Dubois, F, Barin, F & Goudeau, A, 1998. [Anti-HCV serology for screening, diagnosis and surveillance of hepatitis C: role of the immunoblot]. *Annales de biologie clinique*, 56(4), p.417-426.
- Dubuisson, J et al., 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology*, 68(10), p.6147-6160.
- Dubuisson, J & Rice, C M, 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of Virology*, 70(2), p.778-786.
- Dubuisson, Jean et al., 2000. Glycosylation of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E1 Is Dependent on the Presence of a Downstream Sequence on the Viral Polyprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), p.30605 -30609.
- Egger, D. et al., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology*, 76(12), p.5974-5984.
- Eigen, M., 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Die Naturwissenschaften*, 58(10), p.465-523.
- Einav, S. et al., 2008. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology*, 47(3), p.827-835.
- Engering, A. et al., 2002. The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *Journal of Immunology*, 168(5), p.2118 -2126.
- Esteban, Juan I., Sauleda, S. & Quer, Josep, 2008. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*, 48(1), p.148-162.
- Evans, M.J. et al., 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137), p.801-805.
- Fafi-Kremer, S et al., 2008. [Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 32(5 Pt 1), p.491-498.
- Fafi-Kremer, Samira et al., 2010. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), p.2019-2031.
- Falkowska, E. et al., 2007. Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. *Journal of Virology*, 81(15), p.8072-8079.
- Fan, Z. et al., 1999. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *Journal of Medical Virology*, 59(2), p.131-134.

- Farci, P et al., 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), p.7792 -7796.
- Farci, P et al., 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), p.15394-15399.
- Farci, P & Purcell, R H, 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Seminars in Liver Disease*, 20(1), p.103-126.
- Farci, P, 2002. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. [Science 1989;244:359-362]. *Journal of Hepatology*, 36(5), p.582-585
- Feinstone, S M et al., 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England Journal of Medicine*, 292(15), p.767-770.
- Fenouillet, E. et al., 2008. Contribution of Redox Status to Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein Function and Antigenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), p.26340 -26348.
- Figlerowicz, Magdalena et al., 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), p.488-518.
- Fitzmaurice, K. et al., 2011. Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection. *Gut*, 60(11), p.1563-1571.
- Flint, Mike et al., 1999. Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor, CD81. *Journal of Virology*, 73(8), p.6235 -6244.
- Flint, M. & McKeating, J.A., 1999. The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *Journal of General Virology*, 80(8), p.1943 -1947.
- Fofana, I. et al., 2012. Mutations that Alter Use of Hepatitis C Virus Cell Entry Factors Mediate Escape from Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology*, 1;143(1), p.223-233.
- Fournillier-Jacob, A. et al., 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *Journal of General Virology*, 77(5), p.1055 -1064.
- Foy, E. et al., 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 300(5622), p.1145-1148.
- De Francesco, R. & Migliaccio, G., 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, 436(7053), p.953-960.
- Franck, N. et al., 2005. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *Journal of Virology*, 79(5), p.2700-2708.

- Fraser, J. et al., 2011. Hepatitis C Virus (HCV) Envelope Glycoproteins E1 and E2 Contain Reduced Cysteine Residues Essential for Virus Entry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), p.31984 -31992.
- Friebe, P et al., 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of Virology*, 75(24), p.12047-12057.
- Gale, M, Jr et al., 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), p.5208-5218.
- Gal-Tanamy, M. et al., 2008. In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), p.19450 - 19455.
- Gao, L. et al., 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology*, 78(7), p.3480-3488.
- Garaigorta, U. & Chisari, Francis V, 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host & Microbe*, 6(6), p.513-522.
- Gardner, J.P. et al., 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), p.4498 -4503.
- Garrone, P. et al., 2011. A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. *Science Translational Medicine*, 3(94), p.94ra71.
- Garry, R.F. & Dash, S., 2003. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology*, 307(2), p.255-265.
- Gastaminza, P. et al., 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of Virology*, 82(5), p.2120-2129.
- Gastaminza, P. et al., 2010. Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *Journal of Virology*, 84(21), p.10999-11009.
- Gaudy, C. et al., 2005. Mutations within the hepatitis C virus genotype 1b E2-PePHD domain do not correlate with treatment outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), p.750-754.
- Gaudy-Graffin, C. et al., 2010. Use of an anti-Hepatitis C Virus (HCV) IgG avidity assay to identify recent HCV infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), p.3281 -3287.
- Ge, D. et al., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), p.399-401.
- Gerlach, J T et al., 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 117(4), p.933-941.

- Gerlach, J Tilman et al., 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, 125(1), p.80-88.
- Germi, R. et al., 2002a. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of Medical Virology*, 68(2), p.206-215.
- Germi, R. et al., 2002b. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292(1), p.162-168.
- Gerotto, M. et al., 2000. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology*, 119(6), p.1649-1655.
- Goffard, A. et al., 2005. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, 79(13), p.8400-8409.
- Goffard, A. & Dubuisson J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, 85(3-4), p.295-301.
- Gómez, J. et al., 1999. Hepatitis C viral quasispecies. *Journal of Viral Hepatitis*, 6(1), p.3-16.
- González-Candelas, F., López-Labrador, F.X. & Bracho, M.A., 2011. Recombination in Hepatitis C Virus. *Viruses*, 3(10), p.2006-2024.
- Gosert, R. et al., 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of Virology*, 77(9), p.5487-5492.
- Graham, F.L. et al., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), p.59-74.
- Grakoui, A et al., 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), p.10583-10587.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I. & McLauchlan, John, 2005. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *Journal of General Virology*, 86(Pt 5), p.1415-1421.
- Griffin, S.D.C. et al., 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS letters*, 535(1-3), p.34-38.
- Grove, J. et al., 2007. Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of Virology*, 81(7), p.3162-3169.
- Grüner, N.H. et al., 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5), p.1528-1536.
- Guindon, S. et al., 2005. PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, 33, p.W557-559.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), p.696-704.

- Haberstroh, A. et al., 2008. Neutralizing Host Responses in Hepatitis C Virus Infection Target Viral Entry at Postbinding Steps and Membrane Fusion. *Gastroenterology*, 135(5), p.1719-1728.e1.
- Hadlock, K G et al., 2001. Cross-reactivity and clinical impact of the antibody response to hepatitis C virus second envelope glycoprotein (E2). *Journal of Medical Virology*, 65(1), p.23-29.
- von Hahn, Thomas et al., 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*, 132(2), p.667-678.
- von Hahn, Thomas et al., 2006. Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*, 43(5), p.932-942.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E.-I., 2009. Low pH-dependent Hepatitis C Virus Membrane Fusion Depends on E2 Integrity, Target Lipid Composition, and Density of Virus Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), p.17657 -17667.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J. & Dore, G.J., 2012. Case definitions for acute hepatitis C virus infection: A systematic review. *Journal of Hepatology*. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796896>
- Han, Q. et al., 2009. Compensatory mutations in NS3 and NS5A proteins enhance the virus production capability of hepatitis C reporter virus. *Virus research*, 145(1), p.63-73.
- Harris, H.J. et al., 2010a. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(27), p.21092-21102.
- Harris, H.J. et al., 2010b. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(27), p.21092-21102.
- Hatzakis, A. et al., 2011. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. *Journal of Viral Hepatitis*, 18, p.1-16.
- Helle, Francois et al., 2010. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Incorporated into Infectious Virions. *Journal of Virology*, 84(22), p.11905-11915.
- Helle, Francois et al., 2007. The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *Journal of Virology*, 81(15), p.8101-8111.
- Hernandez, M.D. & Sherman, K.E., 2011. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Current opinion in HIV and AIDS*, 6(6), p.478-482.
- Hijikata, M. et al., 1993. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of Virology*, 67(4), p.1953-1958.
- Honda, M. et al., 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. *Journal of Virology*, 73(2), p.1165-1174.

- Hong, X. et al., 2005. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 11(46), p.7302-7307.
- Hsu, M. et al., 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), p.7271 -7276.
- Huang, L. et al., 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *Journal of biological chemistry*, 280(43), p.36417-36428.
- Hudson, R.R., Boos, D.D. & Kaplan, N.L., 1992. A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, 9(1), p.138-151.
- Hudson, R.R. & Kaplan, N.L., 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*, 111(1), p.147-164.
- Hudson, R.R., Slatkin, M. & Maddison, W.P., 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2), p.583-589.
- Hügler, T. et al., 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 284(1), p.70-81.
- Hung, C.-H. et al., 2003. Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis*, 10(2), p.87-94.
- Ito, T. & Lai, M.M., 1999. An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology*, 254(2), p.288-296.
- Jirasko, V. et al., 2008. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), p.28546-28562.
- Jo, J. et al., 2009. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 136(4), p.1391-1401.
- Jo, J. et al., 2011. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 3), p.477-493.
- Johansson, D.X. et al., 2007. Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), p.16269 -16274.
- Jones, C.T. et al., 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*, 81(16), p.8374-8383.
- Jones, D.M. et al., 2009. The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *Journal of Virology*, 83(5), p.2163-2177.

- Jopling, C.L. et al., 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309(5740), p.1577-1581.
- Kalinina, O. et al., 2002. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology*, 76(8), p.4034-4043.
- Kamal, S.M. et al., 2004. Pegylated interferon α therapy in acute hepatitis C: Relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology*, 39(6), p.1721-1731.
- Kanda, T. et al., 2007. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *Journal of Virology*, 81(2), p.669-676.
- Kanno, A. & Kazuyama, Y., 2002. Immunoglobulin G antibody avidity assay for serodiagnosis of hepatitis C virus infection. *Journal of Medical Virology*, 68(2), p.229-233.
- Kapadia, S.B. et al., 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of Virology*, 81(1), p.374-383.
- Kaplan, D.E. et al., 2007. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 132(2), p.654-666.
- Kasturi, Lakshmi et al., 1995. The Hydroxy Amino Acid in an Asn-X-Ser/Thr Sequon Can Influence N-Linked Core Glycosylation Efficiency and the Level of Expression of a Cell Surface Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), p.14756-14761.
- Kato, N et al., 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 67(7), p.3923-3930.
- Kato, Nobuyuki et al., 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Research*, 22(2), p.107-123.
- Keck, Z.-y. et al., 2009. Mutations in Hepatitis C Virus E2 Located outside the CD81 Binding Sites Lead to Escape from Broadly Neutralizing Antibodies but Compromise Virus Infectivity. *Journal of Virology*, 83, p.6149-6160.
- Keck, Z.-Y. et al., 2011. Mapping a Region of Hepatitis C Virus E2 That Is Responsible for Escape from Neutralizing Antibodies and a Core CD81-Binding Region That Does Not Tolerate Neutralization Escape Mutations. *Journal of Virology*, 85, p.10451-10463.
- Keck, Zhen-Yong et al., 2005. Analysis of a Highly Flexible Conformational Immunogenic Domain A in Hepatitis C Virus E2. *Journal of Virology*, 79(21), p.13199-13208.
- Keck, Zhen-Yong et al., 2004. Hepatitis C Virus E2 Has Three Immunogenic Domains Containing Conformational Epitopes with Distinct Properties and Biological Functions. *Journal of Virology*, 78(17), p.9224-9232.

- Keck, Zhen-Yong et al., 2007. Immunogenic and Functional Organization of Hepatitis C Virus (HCV) Glycoprotein E2 on Infectious HCV Virions. *Journal of Virology*, 81(2), p.1043-1047.
- Klimashevskaya, S. et al., 2007. Distinguishing acute from chronic and resolved hepatitis C virus (HCV) infections by measurement of anti-HCV immunoglobulin G avidity index. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), p.3400-3403.
- Knodell, R.G. et al., 1976. Efficacy of prophylactic gamma-globulin in preventing non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet*, 1(7959), p.557-561.
- Koch, J.O. & Bartenschlager, R., 1999. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Journal of Virology*, 73(9), p.7138-7146.
- Kolykhalov, A.A. et al., 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of Virology*, 74(4), p.2046-2051.
- Koppel, E.A. et al., 2005. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology*, 210(2-4), p.203-210.
- Kosakovsky Pond, S.L. & Frost, S.D.W., 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), p.1208-1222.
- Koutsoudakis, G. et al., 2006. Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *Journal of Virology*, 80(11), p.5308-5320.
- Krawczynski, K et al., 1996. Effect of immune globulin on the prevention of experimental hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 173(4), p.822-828.
- Krey, Thomas et al., 2010. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathogens*, 6(2), p.e1000762.
- Kuniholm, M.H. et al., 2010. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology*, 51(5), p.1514-1522.
- Kunkel, M. et al., 2001. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*, 75(5), p.2119-2129.
- Kurbanov, F. et al., 2008. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatology Research*, 38(5), p.457-464.
- Lai, W.K. et al., 2006. Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium: A Role for Capturing Hepatitis C Virus Particles. *The American Journal of Pathology*, 169(1), p.200-208.
- Lavie, M. et al., 2006. Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology*, 44(6), p.1626-1634.

- Lavillette, D. et al., 2005. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 79(10), p.6023.
- Lavillette, Dimitri et al., 2007. Characterization of Fusion Determinants Points to the Involvement of Three Discrete Regions of Both E1 and E2 Glycoproteins in the Membrane Fusion Process of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 81(16), p.8752-8765.
- Lavillette, Dimitri et al., 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, 41(2), p.265-274.
- Lavillette, Dimitri et al., 2006. Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Low pH-dependent Membrane Fusion with Liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), p.3909 - 3917.
- Law, M. et al., 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature Medicine*, 14(1), p.25-27.
- Lechmann, M. et al., 2001. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology*, 34(2), p.417-423.
- Lechner, F. et al., 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*, 191(9), p.1499-1512.
- Lee, Y.-M. et al., 2010. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w. *Journal of Medical Virology*, 82(1), p.57-68.
- Legrand-Abravanel, F. et al., 2007. New Natural Intergenotypic (2/5) Recombinant of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 81(8), p.4357-4362.
- Levy, S. & Shoham, T., 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews. Immunology*, 5(2), p.136-148.
- Li, H.-F. et al., 2009. Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. *Journal of Biomedical Science*, 16, p.89.
- Li, Kejun et al., 2008. Intersubunit Disulfide Isomerization Controls Membrane Fusion of Human T-Cell Leukemia Virus Env. *Journal of Virology*, 82(14), p.7135-7143.
- Li, Kui et al., 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), p.2992-2997.
- Li, P. et al., 2007. Engineering of N-glycosylation of hepatitis C virus envelope protein E2 enhances T cell responses for DNA immunization. *Vaccine*, 25(8), p.1544-1551.
- Librado, P. & Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), p.1451-1452.

- Lin, C. et al., 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology*, 68(8), p.5063-5073.
- Lindenbach, Brett D et al., 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), p.3805-3809.
- Lindenbach, Brett D et al., 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309(5734), p.623-626.
- Liu, S. et al., 2009. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *Journal of Virology*, 83(4), p.2011-2014.
- Logvinoff, C. et al., 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), p.10149.
- Lohmann, V et al., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), p.110-113.
- Lozach, P.-Y. et al., 2004. C-type Lectins L-SIGN and DC-SIGN Capture and Transmit Infectious Hepatitis C Virus Pseudotype Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), p.32035 -32045.
- Lozach, P.-Y. et al., 2003. DC-SIGN and L-SIGN Are High Affinity Binding Receptors for Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), p.20358 -20366.
- Lundin, M. et al., 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of Virology*, 77(9), p.5428-5438.
- Lupberger, J. et al., 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine*, 17(5), p.589-595.
- Ma, Y. et al., 2011. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of Virology*, 85(1), p.86-97.
- Maekawa, T. et al., 2008. ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene*, 27(8), p.1045-1054.
- Maillard, P. et al., 2006. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB journal*, 20(6), p.735-737.
- Maniez-Montreuil, M. & Dubois, F, 2000. [Interpretation of hepatitis C virus serology: immunoblot and genome amplification]. *Transfusion clinique et biologique*, 7 Suppl 1, p.25s-30s.

- Martell, M. et al., 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology*, 66(5), p.3225-3229.
- Martinot-Peignoux, M. et al., 1999. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. *Journal of viral hepatitis*, 6(6), p.435-443.
- Maurin, G. et al., 2011. Identification of Interactions in the E1E2 Heterodimer of Hepatitis C Virus Important for Cell Entry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), p.23865 - 23876.
- Mazumdar, B. et al., 2011. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology*. 54(4):1149-1156.
- McCaffrey, Kathleen et al., 2007. Expression and Characterization of a Minimal Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Core Domain That Retains CD81 Binding. *Journal of Virology*, 81(17), p.9584-9590.
- McCaffrey, Kathleen et al., 2011. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of General Virology*, 92(1), p.112 -121.
- McKeating, J A et al., 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *Journal of Virology*, 78(16), p.8496-8505.
- McKiernan, S.M. et al., 2004. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology*, 40(1), p.108-114.
- McLauchlan, John et al., 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO Journal*, 21(15), p.3980-3988.
- Meertens, L. et al., 2008. The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 82(7), p.3555-3560.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T., 2006. Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *Journal of Virology*, 80(23), p.11571 -11578.
- Mellquist, J.L. et al., 1998. The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency. *Biochemistry*, 37(19), p.6833-6837.
- Mercer, D.F. et al., 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*, 7(8), p.927-933.
- Meuleman, P. et al., 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology*, 48(6), p.1761-1768.
- Meunier, J.C. et al., 1999. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *Journal of General Virology*, 80(4), p.887 -896.

- Meunier, J.C. et al., 2005. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), p.4560.
- Meunier, J.-C., Russell, Rodney S., Engle, Ronald E., et al., 2008. Apolipoprotein C1 Association with Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 82(19), p.9647-9656.
- Meunier, J.-C., Russell, Rodney S., Goossens, V., et al., 2008. Isolation and Characterization of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to the E1 Glycoprotein of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 82(2), p.966-973.
- Meyer, K, Basu, A & Ray, R, 2000. Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology*, 276(1), p.214-226.
- Meylan, E. et al., 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437(7062), p.1167-1172.
- Michalak, J.P. et al., 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology*, 78(9), p.2299 -2306.
- Miller, R.H. & Purcell, R H, 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6), p.2057-2061.
- Miyazari, Y. et al., 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*, 9(9), p.1089-1097.
- Mizushima, H. et al., 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *Journal of virology*, 68(10), p.6215-6222.
- Molina, S. et al., 2008. Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent. *Journal of Virology*, 82(1), p.569-574.
- Molina, S. et al., 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 46(3), p.411-419.
- Monazahian, M. et al., 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology*, 57(3), p.223-229.
- Mondelli, Mario U., Cerino, A. & Cividini, A., 2005. Acute hepatitis C: diagnosis and management. *Journal of Hepatology*, 42(1, Supplement), p.S108-S114.
- Montes-Cano, M.A. et al., 2010. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, 52(1), p.33-37.
- Moradpour, D et al., 1996. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, 222(1), p.51-63.

- Moradpour, Darius et al., 2004. Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *Journal of Virology*, 78(14), p.7400-7409.
- Moreau, I. et al., 2006. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. *Virology Journal*, 3, p.95.
- Morel, V. et al., 2011. Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(2), p.77-83.
- Morel, Virginie et al., 2010. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. *Journal of Clinical Virology*, 47(4), p.382-386.
- Moreno, M.P. et al., 2006. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology Journal*, 3, p.87.
- Morin, T. & Pariente, A., 2002. [Acute hepatitis C: a retrospective study of 62 cases]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 26(11), p.994-1000.
- Mothes, W. et al., 2000. Retroviral Entry Mediated by Receptor Priming and Low pH Triggering of an Envelope Glycoprotein. *Cell*, 103(4), p.679-689.
- Mühlberger, N. et al., 2009. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC public health*, 9, p.34.
- Nahmias, Y. et al., 2006. Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology*, 43(2), p.257-265.
- Nakabayashi, H. et al., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42(9), p.3858-3863.
- Nattermann, J et al., 2006. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut*, 55(6), p.869-877.
- Nattermann, Jacob et al., 2006. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 44(4), p.945-954.
- Neddermann, P., Clementi, A. & De Francesco, R., 1999. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *Journal of Virology*, 73(12), p.9984-9991.
- Netski, D.M. et al., 2005. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 41(5), p.667-675.
- Neumann, A.U. et al., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282(5386), p.103-107.

- Neumann-Haefelin, C. et al., 2006. Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology*, 43(3), p.563-572.
- Neumann-Haefelin, C. et al., 2010. Protective effect of human leukocyte antigen B27 in hepatitis C virus infection requires the presence of a genotype-specific immunodominant CD8+ T-cell epitope. *Hepatology*, 51(1), p.54-62.
- Nielsen, S.U. et al., 2006. Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *Journal of Virology*, 80(5), p.2418-2428.
- Noppornpanth, S. et al., 2006. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 80(15), p.7569-7577.
- Ogata, N. et al., 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), p.3392-3396.
- Okamoto, H et al., 1992. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology*, 190(2), p.894-899.
- Olenina, L.V. et al., 2005. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of Viral Hepatitis*, 12(6), p.584-593.
- Op De Beeck, A. et al., 2004. Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, 78(6), p.2994-3002.
- Op De Beeck, A. et al., 2000. The Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2 Play a Major Role in Heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), p.31428 -31437.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, Laurence & Dubuisson, Jean, 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of General Virology*, 82(11), p.2589 -2595.
- Orland, J.R., Wright, T.L. & Cooper, Stewart, 2001. Acute hepatitis C. *Hepatology*, 33(2), p.321-327.
- Osburn, W.O. et al., 2010. Spontaneous Control of Primary Hepatitis C Virus Infection and Immunity Against Persistent Reinfection. *Gastroenterology*, 138(1), p.315-324.
- Owen, D.M. et al., 2009. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology*, 394(1), p.99-108.
- Owsianka, A et al., 2001. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *Journal of General Virology*, 82(Pt 8), p.1877-1883.
- Owsianka, A. et al., 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, 79(17), p.11095.

- Owsianka, A. M et al., 2008. Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of General Virology*, 89(3), p.653.
- Owsianka, A. M. et al., 2006. Identification of Conserved Residues in the E2 Envelope Glycoprotein of the Hepatitis C Virus That Are Critical for CD81 Binding. *Journal of Virology*, 80(17), p.8695-8704.
- Pang, P.S. et al., 2002. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO Journal*, 21(5), p.1168-1176.
- Patel, Arvind H. et al., 2000. Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *Journal of General Virology*, 81(12), p.2873 -2883.
- Patel, J, Patel, A H & McLauchlan, J, 1999. Covalent interactions are not required to permit or stabilize the non-covalent association of hepatitis C virus glycoproteins E1 and E2. *Journal of General Virology*, 80(7), p.1681 -1690.
- Patel, Janisha, Patel, Arvind H. & McLauchlan, John, 2001. The Transmembrane Domain of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Is Required for Correct Folding of the E1 Glycoprotein and Native Complex Formation. *Virology*, 279(1), p.58-68.
- Paul, D. et al., 2011. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *Journal of Virology*, 85(14), p.6963-6976.
- Pavlović, D. et al., 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), p.6104-6108.
- Penin, Francois et al., 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. *Journal of Virology*, 75(12), p.5703-5710.
- Penin, François, Dubuisson, Jean, et al., 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 39(1), p.5-19.
- Penin, François, Brass, V., et al., 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), p.40835-40843.
- Pérez-Berna, A.J. et al., 2006. The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry*, 45(11), p.3755-3768.
- Perotti, M. et al., 2008. Identification of a Broadly Cross-Reacting and Neutralizing Human Monoclonal Antibody Directed against the Hepatitis C Virus E2 Protein. *Journal of Virology*, 82(2), p.1047-1052.
- Pestka, J.M. et al., 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), p.6025-6030.

- Phan, T. et al., 2009. Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of virology*, 83(17), p.8379-8395.
- Piazza, M. et al., 1997. Sexual transmission of the hepatitis C virus and efficacy of prophylaxis with intramuscular immune serum globulin. A randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, 157(14), p.1537-1544.
- Pietschmann, T. et al., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), p.7408 -7413.
- Pileri, P. et al., 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282(5390), p.938-941.
- Ploss, A. et al., 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 457(7231), p.882-886.
- Ploss, A. & Evans, M.J., 2012. Hepatitis C virus host cell entry. *Current Opinion in Virology*, 2(1), p.14-19.
- van der Poel, C.L., 1999. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risks. *Journal of hepatology*, 31 Suppl 1, p.101-106.
- Le Pogam, S. et al., 1998. Hepatitis C in a hemodialysis unit: molecular evidence for nosocomial transmission. *Journal of clinical microbiology*, 36(10), p.3040-3043.
- Pohlmann, S. et al., 2003. Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*, 77(7), p.4070-4080.
- Pöhlmann, S. et al., 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), p.2670 -2675.
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W. & Muse, S.V., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21(5), p.676 -679.
- Popescu, C. & Dubuisson, Jean, 2009. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*, 102, p.63-74.
- Popescu, C.-I. et al., 2011. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathogens*, 7(2), p.e1001278.
- Popescu, C.-I. & Dubuisson, Jean, 2010. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*, 102(1), p.63-74.
- Posada, D., Crandall, K.A. & Holmes, Edward C, 2002. Recombination in evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 36, p.75-97.
- Puntoriero, G. et al., 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *The EMBO Journal*, 17(13), p.3521-3533.

- Qiao, M. et al., 2003. Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. *Hepatology*, 37(1), p.52-59.
- Quiroga, J.A. et al., 1991. IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, 14(1), p.38-43.
- Rahner, C., Mitic, L.L. & Anderson, J.M., 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120(2), p.411-422.
- Raimondo, G., Cacciamo, G. & Saitta, C., 2005. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection: additive players in chronic liver disease? *Annals of Hepatology*, 4(2), p.100-106.
- Raney, K.D. et al., 2010. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), p.22725-22731.
- Rauch, A. et al., 2010. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*, 138(4), p.1338-1345.e7.
- Ray, S C et al., 1999. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *Journal of virology*, 73(4), p.2938-2946.
- Ray, S C et al., 2000. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees. *Journal of Virology*, 74(7), p.3058-3066.
- Reed, K.E. & Rice, C M, 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 242, p.55-84.
- Rehermann, Barbara, 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7), p.1745-1754.
- Reynolds, G.M. et al., 2008. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology*, 47(2), p.418-427.
- Rhainds, D. & Brissette, L., 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(1), p.39-77.
- Ribeiro, R.M. et al., 2012. Quantifying the Diversification of Hepatitis C Virus (HCV) during Primary Infection: Estimates of the In Vivo Mutation Rate. *PLoS Pathogens*, 8(8), p.e1002881.
- Richman, D.D. et al., 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), p.4144.

- Rijnbrand, R.C. & Lemon, S M, 2000. Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 242, p.85-116.
- Roberts, E.A. & Yeung, L., 2002. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1), p.S106-113.
- Robertson, B. et al., 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Archives of Virology*, 143(12), p.2493-2503.
- Rocca, P. et al., 2003. [Early treatment of acute hepatitis C with interferon alpha-2b or interferon alpha-2b plus ribavirin: study of sixteen patients]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 27(3 Pt 1), p.294-299.
- Roccasecca, R. et al., 2003. Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. *Journal of Virology*, 77(3), p.1856-1867.
- Rocha-Perugini, V. et al., 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PloS One*, 3(4), p.e1866.
- Roingard, P & Hourieux, C., 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(3), p.157-164.
- Roohvand, F. et al., 2009. Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), p.13778 -13791.
- Rosa, D. et al., 1996. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(5), p.1759 -1763.
- Rothwangl, K. et al., 2008. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: Putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virology Journal*, 5(1), p.46.
- Roudot-Thoraval, Françoise, 2002. [Modifications of epidemiological characteristics of hepatitis C]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 26 Spec No 2, p.B138-143.
- Rouillé, Y. et al., 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 80(6), p.2832-2841.
- Russ, W.P. & Engelman, D.M., 2000. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of Molecular Biology*, 296(3), p.911-919.
- Russell, R. S et al., 2009. Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *Journal of Viral Hepatitis*, 16(9), p.621-632.

- Rychłowska, M. et al., 2011. Comprehensive linker-scanning mutagenesis of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins reveals new structure–function relationships. *Journal of General Virology*, 92(10), p.2249 -2261.
- Sabile, A. et al., 1999. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30(4), p.1064-1076.
- Sagar, M. et al., 2006. Human Immunodeficiency Virus Type 1 V1-V2 Envelope Loop Sequences Expand and Add Glycosylation Sites over the Course of Infection, and These Modifications Affect Antibody Neutralization Sensitivity. *Journal of Virology*, 80(19), p.9586-9598.
- Sainz, B., Jr et al., 2012. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*, 18(2), p.281-285.
- Saito, S. et al., 1996. Comparison of hypervariable regions (HVR1 and HVR2) in positive- and negative-stranded hepatitis C virus RNA in cancerous and non-cancerous liver tissue, peripheral blood mononuclear cells and serum from a patient with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 67(2), p.199-203.
- Saitou, M. et al., 1997. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *European Journal of Cell Biology*, 73(3), p.222-231.
- Sakai, A. et al., 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), p.11646-11651.
- Sánchez-Quijano, A. et al., 1988. Prevention of post-transfusion non-A, non-B hepatitis by non-specific immunoglobulin in heart surgery patients. *Lancet*, 1(8597), p.1245-1249.
- Sánchez-Tapias, J.M., 1999. Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 31 Suppl 1, p.107-112.
- Santantonio, T. et al., 2003. Natural course of acute hepatitis C: a long-term prospective study. *Digestive and liver disease*, 35(2), p.104-113.
- Santantonio, T. et al., 2006. Risk Factors and Outcome among a Large Patient Cohort with Community-Acquired Acute Hepatitis C in Italy. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), p.1154-1159.
- Santolini, E., Migliaccio, G & La Monica, N., 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology*, 68(6), p.3631-3641.
- Sautto, G. et al., 2012. Anti-hepatitis C virus E2 (HCV/E2) glycoprotein monoclonal antibodies and neutralization interference. *Antiviral research*, 96(1), p.82-89.
- Scarselli, E. et al., 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, 21(19), p.5017-5025.

- Schaller, T. et al., 2007. Analysis of Hepatitis C Virus Superinfection Exclusion by Using Novel Fluorochrome Gene-Tagged Viral Genomes. *Journal of Virology*, 81(9), p.4591-4603.
- Schneeberger, E.E. & Lynch, R.D., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *American journal of physiology. Cell physiology*, 286(6), p.C1213-1228.
- Schulze zur Wiesch, J. et al., 2005. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *Journal of Immunology*, 175(6), p.3603-3613.
- Selby, Mark J. et al., 1994. Complex Processing and Protein:Protein Interactions in the E2:NS2 Region of HCV. *Virology*, 204(1), p.114-122.
- Sène, D., Limal, N. & Cacoub, P., 2004. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metabolic brain disease*, 19(3-4), p.357-381.
- Sentandreu, V. et al., 2008. Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PloS One*, 3(9), p.e3239.
- Shakin-Eshleman, Susan H., Spitalnik, Steven L. & Kasturi, Lakshmi, 1996. The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core-glycosylation Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), p.6363 - 6366.
- Sharma, N.R. et al., 2011. Hepatitis C Virus Is Primed by CD81 Protein for Low pH-dependent Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), p.30361 -30376.
- Shi, W. et al., 2012. Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PloS One*, 7(7), p.e41997.
- Shimizu, Y.K. et al., 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*, 23(2), p.205-209.
- Shirai, M. et al., 1999. T Cell Recognition of Hypervariable Region-1 from Hepatitis C Virus Envelope Protein with Multiple Class II MHC Molecules in Mice and Humans: Preferential Help for Induction of Antibodies to the Hypervariable Region. *Journal of Immunology*, 162(1), p.568 -576.
- Shoukry, N.H. et al., 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(12), p.1645-1655.
- Simmonds, P et al., 1994. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, 19(5), p.1321-1324.
- Simmonds, P et al., 1996. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *The Journal of General Virology*, 77 (Pt 12), p.3013-3024.
- Simmonds, P, 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 4), p.693-712.

- Simmonds, Peter et al., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42(4), p.962-973.
- Simmonds, Peter, 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *Journal of General Virology*, 85(11), p.3173 -3188.
- Skehel, J.J. & Wiley, D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virusentry : The Influenza Hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 69, p.531-569.
- Smith, D.B., 1999. Evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 6 Suppl 1, p.41-46.
- Soilleux, E.J. et al., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(3), p.445 -457.
- Song, Y. et al., 2006. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of Virology*, 80(23), p.11579-11588.
- Spångberg, K., Wiklund, L. & Schwartz, S., 2001. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *Journal of General Virology*, 82(Pt 1), p.113-120.
- Stapleford, K.A. & Lindenbach, Brett D, 2011. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of Virology*, 85(4), p.1706-1717.
- Steinhauer, D.A., Domingo, E. & Holland, J.J., 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), p.281-288.
- Steinhoff, U. et al., 1995. Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *Journal of Virology*, 69(4), p.2153-2158.
- Steinmann, D. et al., 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *Journal of Virology*, 78(17), p.9030-9040.
- Sugg, U. et al., 1985. Hepatitis B immune globulin to prevent non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet*, 1(8425), p.405-406.
- Tai, C.L. et al., 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *Journal of Virology*, 70(12), p.8477-8484.
- Takaki, A. et al., 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Medicine*, 6(5), p.578-582.
- Tanaka, T et al., 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(2), p.744-749.

- Taniguchi, S. et al., 1993. A Structurally Flexible and Antigenically Variable N-Terminal Domain of the Hepatitis C Virus E2/NS1 Protein: Implication for an Escape from Antibody. *Virology*, 195(1), p.297-301.
- Tarr, A.W et al., 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology*, 43(3), p.592-601.
- Tarr, A.W. et al., 2007. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *Journal of General Virology*, 88(11), p.2991 -3001.
- Tarr, A.W. et al., 2011. Naturally occurring antibodies recognizing linear epitopes in the amino-terminus of the hepatitis C virus E2 protein confer non-interfering, additive neutralization. *Journal of Virology*, 86(5), p.2739-2749
- Taylor, D.R. et al., 1999. Inhibition of the Interferon- Inducible Protein Kinase PKR by HCV E2 Protein. *Science*, 285(5424), p.107 -110.
- Tellinghuisen, T.L. et al., 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), p.48576-48587.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J. & Rice, Charles M, 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*, 435(7040), p.374-379.
- Tester, I. et al., 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *Journal of Experimental Medicine*, 201(11), p.1725-1731.
- Thimme, R et al., 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 194(10), p.1395-1406.
- Thio, C.L. et al., 2002. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *Journal of Virology*, 76(10), p.4792-4797.
- Thomas, David L. et al., 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), p.798-801.
- Thomson, E.C. & Main, J., 2008. Epidemiology of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(11), p.773-781.
- Thomson, M. et al., 2003. The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity. *Journal of Virology*, 77(2), p.862-870.
- Thomssen, R., Bonk, S. & Thiele, A., 1993. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Medical Microbiology and Immunology*, 182(6), p.329-334.
- Tibbs, C.J., 1995. Methods of transmission of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 2(3), p.113-119.

- Tillmann, H.L. et al., 2010. A Polymorphism Near IL28B Is Associated With Spontaneous Clearance of Acute Hepatitis C Virus and Jaundice. *Gastroenterology*, 139(5), p.1586-1592.e1.
- Timm, Joerg et al., 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *Journal of Experimental Medicine*, 200(12), p.1593-1604.
- Timpe, J.M. et al., 2008. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*, 47(1), p.17-24.
- Tokita, H. et al., 1995. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *Journal of General virology*, 76 (Pt 9), p.2329-2335.
- Tokita, H. et al., 1994. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), p.11022-11026.
- Troesch, M. et al., 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*, 352(2), p.357-367.
- Tscherne, D.M. et al., 2006. Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. *Journal of Virology*, 80(4), p.1734 -1741.
- Uyttendaele, S. et al., 1994. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox sanguinis*, 66(2), p.122-129.
- Vanwolleghem, T. et al., 2008. Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology*, 47(6), p.1846-1855.
- Varchetta, S. et al., 2012. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 56(3), p.841-849.
- Viazov, S, Widell, A & Nordenfelt, E., 2000. Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection*, 28(1), p.21-25.
- Villanueva RA, Rouillé Y, Dubuisson J., 2005. Interactions Between Virus Proteins and Host Cell Membranes During the Viral Life Cycle. *International Review of Cytology* 245, p.171-244.
- Voisset, C. et al., 2005. High Density Lipoproteins Facilitate Hepatitis C Virus Entry through the Scavenger Receptor Class B Type I. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), p.7793 -7799.
- Voisset, C. et al., 2006. High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *Journal of General Virology*, 87(Pt 9), p.2577-2581.
- Wakita, T. et al., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, 11(7), p.791-796.

- Watt, K.D.S. et al., 2010. Evolution of Causes and Risk Factors for Mortality Post-Liver Transplant: Results of the NIDDK Long-Term Follow-Up Study, Evolution of Causes and Risk Factors for Mortality Post-Liver Transplant: Results of the NIDDK Long-Term Follow-Up Study. *American Journal of Transplantation*, 10, p. 1420-1427
- Wei, X. et al., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), p.307-312.
- Weiner, A J et al., 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), p.3468 -3472.
- Weiner, A J et al., 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*, 180(2), p.842-848.
- Weissenhorn, W., Hinz, A. & Gaudin, Y., 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Letters*, 581(11), p.2150-2155.
- Welbourn, S. et al., 2005. Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), p.29604-29611.
- Witteveldt, Jeroen et al., 2009. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *Journal of General Virology*, 90(Pt 1), p.48-58.
- Wozniak, A.L. et al., 2010. Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLoS Pathogens*, 6(9), p.e1001087.
- Wünschmann, S et al., 2000. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Virology*, 74(21), p.10055-10062.
- Wunschmann, S. et al., 2006. In vitro interaction between hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. *Journal of Infectious Diseases*, 194(8), p.1058-1067.
- Wyatt, R. et al., 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 393(6686), p.705-711.
- Xiang, J. et al., 2002. Recombinant hepatitis C virus-like particles expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. *Journal of Medical Virology*, 68(4), p.537-543.
- Xu, Z. et al., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO journal*, 20(14), p.3840-3848.
- Yagnik, A.T. et al., 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 40(3), p.355-366.

- Yang, W. et al., 2008. Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), p.8643-8653.
- Yi, MinKyung et al., 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 81(2), p.629-638.
- Yi, MinKyung et al., 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), p.2310-2315.
- Yi, MinKyung et al., 2009. Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathogens*, 5(5), p.e1000403.
- Yokoyama, K. et al., 2011. Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Archives of Virology*, 156(9), p.1591-1601.
- Yokozaki, S. et al., 2011. Mutations in two PKR-binding domains in chronic hepatitis C of genotype 3a and correlation with viral loads and interferon responsiveness. *Journal of Medical Virology*, 83(10), p.1727-1732.
- Yu, G.-Y. et al., 2006. Palmitoylation and Polymerization of Hepatitis C Virus NS4B Protein. *Journal of Virology*, 80(12), p.6013-6023.
- Zanetti, A.R., Tanzi, E. & Newell, M.L., 1999. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 31 Suppl 1, p.96-100.
- Zein, N.N., 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), p.223-235.
- Zeisel, M.-B. et al., 2007. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 13(36), p.4824-4830.
- Zeisel, Mirjam B et al., 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*, 46(6), p.1722-1731.
- Zhang, Jie et al., 2004. CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology*, 78(3), p.1448-1455.
- Zhang, M. et al., 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, 14(12), p.1229 -1246.
- Zhang, P. et al., 2009. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), p.7537-7541.

Zhang, P. et al., 2007. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), p.8449 -8454.

Zhong, J. et al., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), p.9294-9299.

Annexes

Annexe 1 : Article soumis

.

Rôle des anticorps neutralisants autologues dans la guérison spontanée lors d'une infection par le virus de l'hépatite C

Résumé

Environ 30% des patients infectés par le virus de l'hépatite C guérissent spontanément. Le but de ce travail était (i) d'examiner l'évolution des protéines d'enveloppe en cas de guérison spontanée (ii) de comparer l'infectivité des variants présents aux stades précoces (iii) d'explorer la capacité neutralisante des anticorps (Ac) vis-à-vis des variants majoritaires et minoritaires. Nous avons sélectionné 2 patients avec une hépatite aigue C suivie d'une guérison très rapide. Pour explorer la capacité d'entrée de ces variants et leur aptitude à être neutralisés, nous avons produit des pseudo-particules rétrovirales portant les enveloppes de différents variants. Pour le 1er patient, une réponse neutralisante autologue était détectable précocement, avec un maximum entre le 2ème et le 3ème mois suivant la cytololyse. Elle était encore détectable au 30ème mois. Pour le 2ème patient, des Ac vis-à-vis du variant majoritaire étaient détectés dans le sérum prélevé 4 jours après la cytololyse et dans les sérums plus tardifs. Le titre des Ac était maximum au 5ème mois. La réponse neutralisante est d'apparition précoce et persiste même après l'élimination virale. Ces observations nous questionnent par rapport au rôle éventuel joué par ces Ac dans les cas de recontamination.

Mots-clés : Virus de l'hépatite C, guérison spontanée, évolution, variants, enveloppe, glycosylation, neutralisation autologue

Abstract

Only 30% of Hepatitis C virus infected individuals recover spontaneously. We investigated the mechanisms leading to early HCV clearance. The purpose of this work was: (i) to explore the diversity and the early genetic evolution of the HCV envelope glycoproteins, and the infectivity spectrum of isolated variants and (ii) to analyze the ability of the autologous neutralizing response to control these variants. We selected two patients who developed an acute HCV infection. To explore the impact of mutations on infectivity and neutralization, retroviral pseudoparticles were produced with representative E1 and E2 sequences. For the first case, the maximum neutralizing activity was observed in the serum collected between 2 and 3 months post ALT peak, the activity was still detectable after 30 months. For the second case, autologous neutralizing activity was detected in every serum collected between 4 days and 13 months after. A gradual increase of neutralization activity was observed over time with a maximum 5 to 6 months. We have shown that the neutralizing response was detectable at early stages of primoinfection and was sustained beyond the time at which the virus was cleared. These observations raise interesting questions about the role of such antibodies in case of re-exposure.

Key words: Hepatitis C virus, spontaneous recovery, evolution, variant, envelope, glycosylation, autologous neutralization