

Université de Montréal

Développement d'un modèle animal  
pour la réplication du virus de l'hépatite C.

par

Patrick Labonté

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en microbiologie et immunologie

Février 2000

©Patrick Labonté, 2000



W  
4  
W58  
2001  
N. 013

Université de Montréal  
Faculté des Études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude sur la réplication du virus de l'hépatite C

Présentée par:

Patrick Labonté

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Max. Arella, président du jury  
Samir Mounir, directeur de recherche  
Bernard Willems, membre du jury  
Moulay Alaoui-Jamali, exa. - externe

Thèse acceptée le:

## **Sommaire**

On estime à environ 3% la prévalence du virus de l'hépatite C (VHC) dans le monde. Plus de 170 millions de gens infectés par le VHC développent une infection chronique qui évolue dans bien des cas vers des manifestations cliniques graves telles qu'une hépatite chronique, une cirrhose et/ou un carcinome hépatocellulaire.

Le virus de l'hépatite C ne peut se répliquer que chez l'humain et le chimpanzé *in vivo* et aucun système de réplication efficace n'est disponible *in vitro*. L'absence d'un système de réplication pour le VHC empêche le développement de thérapies antivirales et ralentit considérablement la recherche fondamentale sur ce virus. Afin d'offrir une alternative au chimpanzé, nous avons développé un modèle animal basé sur l'infection *ex vivo* de cellules tumorales issues d'un carcinome hépatocellulaire humain suivie d'une réimplantation des cellules infectées directement dans le foie des souris.

Pour ce faire, nous avons isolé une lignée cellulaire, nommé HuT7-3, capable de coloniser le foie des souris nude et de produire des tumeurs orthotopiques de façon reproductible. En l'absence du VHC, les souris inoculées avec les cellules HuT7-3 peuvent servir de modèle orthotopique pour le cancer du foie. En effet, nous avons validé l'utilisation de ce modèle de cancer du foie en démontrant que la croissance de la tumeur orthotopique est inhibée par l'agent antitumoral doxorubicin. En présence du VHC, les cellules tumorales sont utilisées comme support cellulaire pour l'infection de souris nude et

permet l'établissement d'une infection persistante chez l'animal. La réplication virale chez les souris a été caractérisée par RT-PCR et immunohistochimie (IHC). Les résultats obtenus montrent que 42 jours post-infection, l'ARN viral est présent dans la tumeur, le foie et le sérum des souris infectées. La charge virale dans le sérum des souris infectées a été déterminée et est située entre  $10^2$ - $10^4$  génomes équivalents/ml. En utilisant une cohorte de 43 souris, nous avons observé une corrélation directe entre la taille des tumeurs et la présence de l'ARN viral dans le foie des souris. De plus, la protéine non-structurale NS5B a été observée par IHC dans les hépatocytes de la souris près de la veine porte. Nous avons également montré le développement d'une réponse humorale dirigée contre le virus six semaines post-infection. Nos résultats indiquent que le modèle de tumeur orthotopique développé ici peut servir à la caractérisation d'agents antitumoraux et que suite à l'infection *ex vivo* des cellules HuT7-3 par le VHC, nous avons établi un modèle animal simple, accessible et peu dispendieux pour l'étude de la réplication du VHC.

# Table des Matières

SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	x
INTRODUCTION.....	1
1. HISTORIQUE .....	2
1.1. Hépatites post-transfusionnelles .....	2
1.2. Isolement du génome viral.....	3
2. VIRUS DE L'HÉPATITE C.....	4
2.1. Taxonomie du virus de l'hépatite C.....	4
2.2. Pathologie du virus de l'hépatite C.....	6
2.2.1. Le diagnostic .....	6
2.2.2. Les manifestations cliniques causés par le virus de l'hépatite C .....	6
2.2.3. Le traitement .....	8
2.2.4. Modes de transmission du virus de l'hépatite C.....	10
2.3. Epidémiologie .....	11
2.3.1. Distribution mondiale du virus .....	11
2.3.2. Génotype.....	12
2.3.3. Quasi-espèces du virus.....	13
2.4. Morphologie du virus .....	14
2.5. Structure du génome du virus de l'hépatite C .....	16
2.5.1. Comparaison avec les flavivirus. ....	20
2.6. Traduction de l'ARN viral. ....	23
2.6.1. La fonction «IRES» .....	23
2.6.2. Clivage protéolytique de la polyprotéine virale .....	26
2.6.2.1. Clivage des protéines structurales .....	26
2.6.2.2. Clivage des protéines non-structurales .....	27
2.7. Protéines du virus de l'hépatite C.....	29
2.7.1. Protéines structurales .....	30
2.7.1.1. Protéine Core (C).....	30
2.7.1.2. Les protéines d'enveloppe (E1 et E2).....	32
2.7.2. Protéines non-structurales .....	38
2.7.2.1. La protéine non-structurale p7.....	38
2.7.2.2. La protéine non-structurale NS2 .....	38
2.7.2.3. La protéine non-structurale NS3 .....	40
2.7.2.3.1. Activité sérine protéase (Cpro-2) .....	40
2.7.2.3.2. Activité hélicase.....	44
2.7.2.4. La protéine non-structurale NS4A .....	47
2.7.2.5. La protéine non-structurale NS4B.....	48
2.7.2.6. La protéine non-structurale NS5A .....	49
2.7.2.7. La protéine non-structurale NS5B.....	51
2.8. Cycle de réplication.....	55
2.9. Réponse immunitaire .....	59
2.9.1. Réponse humorale .....	60
2.9.2. Réponse cellulaire .....	62
2.10. Réplication du virus <i>in vivo</i> .....	63
2.11. Réplication du virus <i>in vitro</i> .....	66

2.12. <i>Problématique</i> .....	68
2.13. <i>Objectif</i> .....	69
<b>ARTICLE 1</b> .....	<b>72</b>
<b>ARTICLE 2</b> .....	<b>87</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>121</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>140</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>143</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>208</b>

## Liste des figures

Figure 1. Prévalence du VHC dans le monde.....	12
Figure 2. Distribution mondiale des différents génotypes du VHC.....	13
Figure 3. Organisation du génome du VHC.....	16
Figure 4. Structure secondaire de la région non-codante en 5' de l'ARN du VHC de génotype 1b.....	18
Figure 5. Structure secondaire de la région non-codante en 3' de l'ARN du VHC de génotype 1b.....	20
Figure 6. Organisation du génome des Flaviviridae.....	22
Figure 7. Clivage protéolytique de la polyprotéine du VHC.....	29
Figure 8. Cristallographie au rayon X du domaine protéase de la NS3 couplée avec son cofacteur NS4A.....	42
Figure 9. Sites de clivages reconnus par Cpro-2.....	43
Figure 10. Structure tridimensionnelle de la portion hélicase de la NS3.....	45
Figure 11. Mécanisme proposé pour la séparation des brins d'ARN par l'hélicase du VHC.....	46
Figure 12. Structure tridimensionnelle de la NS5B du VHC.....	55
Figure 13. Cycle de réplication du VHC.....	59

### Article 1.

Figure 1. Activité de la polymérase d'ARN T7 chez les sous-clones des cellules Huh-7.....	79
Figure 2. Tumorigénicité des sous-clones HuT7 <i>in vivo</i> .....	80
Figure 3. Développement de la tumeur humaine orthotopique après injection des cellules HuT7-3.....	81
Figure 4. Coupe histologique du foie et du poumon de souris avec une tumeur humaine orthotopique.....	81
Figure 5. Expression de l'albumine par les cellules HuT7-3 <i>ex vivo</i> .....	82
Figure 6. Inhibition de la croissance des tumeurs sous-cutanées par la Doxorubicine.....	83

### Article 2.

Figure 1. Amplification de la région 5'-RNC et NS3 du VHC par «nested» PCR.....	116
Figure 2. Quantification de l'ARN viral par Amplicor HCV Monitor™ dans le sérum des souris infectées.....	118
Figure 3. Détection de la protéine NS5B sur des coupes de foies.....	119
Figure 4. Réponse humorale chez les souris infectées 6 semaines post- infection.....	120

## Liste des tableaux

Tableau 1. Pourcentage d'identité entre la séquence complète des cadres de lectures ouverts des divers membres des Flaviviridae. ....23

### Article 1.

Tableau 1. Inhibition de la prolifération in vitro par la Doxorubicine sur les sous-clones des cellules Huh-7 exprimant la polymérase d'ARN T7... .....82

Tableau 2. Effet de la Doxorubicine sur les tumeurs humaines orthotopiques dans les souris nude.....83

### Article 2.

Tableau 1. Détection de l'ARN du VHC dans les souris infectées: Corrélation avec la taille des tumeurs.....117

## Liste des abréviations

aa :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
Bip :	Protéine qui se lie aux immunoglobulines
BVDV :	Virus de la diarrhée bovine viral «Bovine viral diarrhea virus»
Cpro :	Protéase du virus de l'hépatite C
CSF :	Virus de la fièvre classique du porc «Classical swine fever»
eIF :	Facteur d'initiation de l'élongation
GBV:	Virus de l'agent GB
HnRNP-L :	Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire L «Hétérogenous nuclear ribonucleoprotein L»
HPT :	Hépatite post-transfusionnelle
IHC :	Immunohistochimie
RHV :	Région hyper variable
IRES :	Site d'entrée directe des ribosomes «Internal ribosome entry site»
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne

	«Polymerization chain reaction»
PKR:	Protéine kinase R
PTB:	Protéine qui se lie aux sequences de polypyrimidine «Polypyrimidine tract-binding protein»
RE :	Réticulum endoplasmique
RNC :	Région non codante
RT :	Transcription inverse «Reverse transcription»
VHA :	Virus de l'hépatite A
VHB :	Virus de l'hépatite B
VHC :	Virus de l'hépatite C
VHG :	Virus de l'hépatite G
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV :	Virus de la stomatite vésiculaire
YFV :	Virus de la fièvre jaune «Yellow Fever Virus»

Je dédie ce travail aux malades infectés par le virus de l'hépatite C.

# Introduction

## 1. Historique

### 1.1. Hépatites post-transfusionnelles

La transmission d'agents infectieux due à la contamination de produits sanguins est devenue une préoccupation majeure de la santé publique avec l'avènement de la transfusion sanguine. La syphilis, la malaria mais surtout la transmission de maladies à étiologie virale étaient fréquentes. Facile à diagnostiquer, la transmission d'hépatites virales était initialement attribuée au virus de l'hépatite B (VHB). Dans les années soixante-dix sont apparus les premiers criblages de produits sanguins permettant d'identifier les échantillons contaminés par le VHB. Le criblage systématique des échantillons sanguins a permis une diminution importante des hépatites post-transfusionnelles (HPT). Cependant, le VHB n'était pas le seul agent responsable des HPT puisque bon nombre de transfusés contractaient des hépatites non-B que l'on attribua par défaut au virus de l'hépatite A (VHA) (Alter et al., 1972; Koretz et al., 1973; Prince et al., 1974). L'apparition de tests sérologiques efficaces pour la détection du VHA (Feinstone et al., 1973; Provost et al., 1973) démontra que le VHA est rarement transmis lors de transfusions sanguines. Ceci suggérait l'existence de un ou plusieurs virus non-A, non-B capables de transmettre des HPT (Feinstone et al., 1975; Dienstag et al., 1977). Les études ultérieures ont montré que l'agent

étiologique des hépatites non-A, non-B pouvait se transmettre de l'homme au chimpanzé (Tabor et al., 1978) et qu'il s'agissait d'un virus à ARN sensible au chloroforme donc enveloppé avec une densité de  $1.24 \text{ g/cm}^3$  (Bradley, 1985). Cette caractérisation très partielle du virus de l'hépatite non-A, non-B se basait sur l'infection de chimpanzés à l'aide de sérums humains auxquels on avait fait subir divers traitements. Compte tenu de la faible charge virale observée chez les individus infectés et du fait que le virus ne se répliquait sur aucune des lignées cellulaires *in vitro*, toutes les méthodes immunologiques conventionnelles pour identifier des anticorps spécifiques au virus ou des antigènes viraux échouaient (Shih et al., 1986).

## 1.2. Isolement du génome viral

Dans les années quatre-vingt, l'identification et plus précisément l'isolement du génome du virus responsable des HPT non-A, non-B est devenue un enjeu majeur de la communauté scientifique et particulièrement des industries pharmaceutiques. L'enjeu de la découverte était énorme. En effet, il était déjà admis que 90% des HPT non-A, non-B étaient causées par ce virus et que l'infection dans la majorité des cas devenait chronique. De plus, des études menées chez des patients infectés avec le virus indiquaient une association directe entre le virus des hépatites non-A, non-B et le développement de cirrhoses et de carcinome hépatocellulaire (Dienstag et Alter, 1986; Okuda et al., 1984).

Finally in 1989, following five years of sustained efforts, the team of Dr. Michael Houghton working at Chiron Inc. reported the isolation of the viral genome as well as the development of a diagnostic kit serving for the identification of the virus which has been named «Hepatitis C Virus» (HCV) (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989). The Hepatitis C Virus is the first virus whose discovery is attributable to a structured, based on molecular biology techniques. To arrive at identifying the viral genome, a complementary DNA bank was constructed from large quantities of serum from chimpanzees infected with the non-A, non-B hepatitis agent. Subsequently, the corresponding proteins were expressed and screened with human serum from a patient with chronic non-A, non-B hepatitis. Through this procedure, a partial clone named 5-1-1 coding for a polypeptide fragment of the virus was identified. With the aid of the 5-1-1 clone, other clones were isolated which allowed the identification of the complete nucleotide sequence of the HCV (Choo et al., 1989).

## 2. Virus de l'hépatite C

### 2.1. Taxonomie du virus de l'hépatite C

Le VHC nouvellement inclus dans le genre hépacivirus fait partie de la famille des Flaviviridae (Robertson et al., 1998). Les Flaviviridae sont divisés en trois genres (flavivirus, pestivirus et hepacivirus). Ces trois genres partagent des similarités en terme de morphologie du virion, de l'organisation du génome et probablement au niveau de la stratégie de réplication de l'ARN viral.

Le genre flavivirus compte plus de 68 membres qui sont pour la plupart transmis aux vertébrés par les arthropodes tels que les tiques et les maringouins. Plusieurs de ces virus causent des encéphalites, méningites et fièvres hémorragiques graves chez l'homme. Le genre pestivirus contient trois groupes de virus retrouvés exclusivement chez les animaux dont certains tel que le virus de la diarrhée virale bovine, sont responsables de pertes économiques importante. Finalement le genre hépacivirus, formé que très récemment, comprend le VHC. Il est fort probable que trois nouveaux virus soient inclus prochainement dans le genre hépacivirus. Ces agents sont le virus humain de l'hépatite G (VHG ou GBV-C) ainsi que les virus GBV-A et GBV-B isolés de tamarins (Simons et al., 1995a, 1995b; Bukh et Apgar, 1997). Tout comme le VHC, le VHG est hépatotropique et cause une hépatite aiguë chez le tamarin (Schlauder et al., 1995). Le tropisme cellulaire des virus GBV-A et GBV-B n'a pas encore été identifié (Bukh et al., 1998; Schlauder et al., 1995). De plus, aucune manifestation clinique n'a été associée à ces deux virus.

## 2.2. Pathologie du virus de l'hépatite C

### 2.2.1. Le diagnostic

L'infection par le virus de l'hépatite C résulte dans plus de 80% des cas en une infection chronique (Di Bisceglie, 1997) et dans la majorité des cas la primo-infection passe inaperçue. On estime que plus de 50% des personnes infectées par le virus, ignorent qu'elles le sont. Le diagnostic d'une infection par le VHC est envisagé lorsqu'un taux anormalement élevé d'aminotransférases hépatiques est observé dans le sang d'un individu. L'analyse des aminotransférases hépatiques est faite de routine sur les échantillons sanguins lors d'un don de sang ou lors d'un examen médical. Le diagnostic est alors confirmé par la détection d'anticorps anti-HCV chez le patient. Lorsque le résultat est équivoque, le diagnostic peut être confirmé par une transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Ce procédé permet l'amplification de la région non-codante en 5' du génome viral isolé à partir d'un échantillon de sérum du patient.

### 2.2.2. Les manifestations cliniques causés par le virus de l'hépatite C

Les symptômes causés par le VHC sont très variables d'une personne à l'autre et l'association entre le virus et les symptômes est souvent difficile à

établir. Plus que 50% des individus infectés chroniquement ne souffriront d'aucun symptôme apparent pendant plusieurs années voire durant toute leur vie. Pour les individus symptomatiques, les signes cliniques fréquemment observés sont souvent associés au développement d'une hépatite chronique. Maux de tête, nausées et état de fatigue chronique sont communs. De plus, plusieurs symptômes ou maladies diverses ont également été associés à une infection chronique par le VHC tels que: purpura palpable, cryoglobulinémie mixte, glomérulonéphrite ainsi qu'une incidence accrue du diabète (Agnello et al., 1992; Cacoub et al., 1999; D'amico et al., 1995; Pawlotsky et al., 1995; Mason et al., 1999).

Bien que l'espérance de vie des individus infectés par le VHC est sensiblement la même que pour les gens non atteints, le développement d'une hépatite chronique peut diminuer grandement la qualité de vie. En ce sens, les manifestations cliniques les plus graves du virus sont le développement de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. On estime à 20% le nombre de porteurs chroniques qui développeront après plusieurs années une cirrhose (Di Bisceglie et al., 1997) qui peut évoluer vers l'insuffisance hépatique et nécessiter une transplantation de foie. Contrairement au virus de l'hépatite B qui peut provoquer un cancer du foie indépendamment de la présence de cirrhose, le VHC induit le cancer du foie uniquement chez les individus ayant développé une cirrhose (sauf cas exceptionnel). Cette observation suggère que le VHC n'est pas directement responsable de la cancérisation, mais que la cirrhose causée par le virus

ainsi que le renouvellement continu des cellules hépatiques induisent le développement des tumeurs. Puisque l'évolution de la cirrhose et l'initiation de la tumeur s'échelonnent sur plusieurs années (10 à 30 ans), le pourcentage exact d'individus qui nécessiteront une transplantation n'est pas connu, mais déjà il a été rapporté que le VHC est impliqué dans 35% des transplantations du foie en Amérique du nord (Chazouilleres et Wright, 1995). La consommation d'alcool accélère la détérioration du foie et est grandement déconseillée chez les individus infectés (Ostapowicz et al., 1998).

### 2.2.3. Le traitement

Le nombre de cirrhoses et de cancers du foie associé au VHC augmente sans cesse dans toutes les régions du globe causant des centaines de milliers de décès annuellement. Jusqu'à présent, il n'existe aucun vaccin contre ce virus. Les traitements disponibles pour contrer l'infection par le VHC reposent sur l'administration d'interféron et de ribavirine. Avant même l'isolement du VHC, l'activité de l'interféron- $\alpha$  sur l'hépatite clinique non-A, non-B était connue (Hoofnagle et al., 1986). Des études subséquentes utilisant trois millions d'unités (MU) d'interféron- $\alpha$  trois fois par semaine ont démontré que 10 à 25% des patients ayant été traités pendant 6 mois éliminent définitivement le virus (Davis et al., 1989; Di Bisceglie et al., 1989). Afin d'améliorer l'efficacité du traitement, plusieurs études ont été effectuées en utilisant des doses supérieures (3, 6, 10 MU) et différents types

d'interférons (Interféron- $\beta$ , interféron consensus et interféron- $\alpha$ 3) (Poynard et al., 1995; Kobayashi et al., 1993; Tong et al., 1993; Simon et al., 1997). Alternativement, l'administration orale de 1000-1200 mg/jour de ribavirine améliore sensiblement les transaminases hépatiques du patient sans toutefois affecter le niveau de réplication du virus (Lee et al., 1998; Dusheiko et al., 1996). Actuellement, la prise conjointe d'interféron- $\alpha$  (3 MU 3 fois/semaine) et de Ribavirine (1000-1200 mg/jour) est actuellement le traitement donnant les meilleurs résultats c'est à dire une diminution marquée du titre viral dans le sang ainsi qu'un retour à la normale du niveau d'ALT chez les patients. Malheureusement, les effets secondaires liés à ce traitement comme l'apparition des symptômes chroniques de la grippe nécessite l'arrêt prématuré du traitement chez 20% des patients. De plus, le virus réapparaît chez 60% des individus dans les 24 semaines suivant l'arrêt du traitement (Poynard et al., 1998; Davis et al., 1998; Reichard et al., 1998). Ces études ont néanmoins permis d'établir une corrélation entre certains facteurs et une réponse positive au traitement. Ces facteurs sont: les génotypes viraux 2 et 3, une charge virale se situant en dessous de  $2 \times 10^6$  copies/ml de sang, un minimum de fibroses au foie et un patient de sexe féminin. Compte tenu des effets secondaires et des résultats mitigés des traitements disponibles, le développement d'un traitement alternatif est essentiel afin de permettre l'élimination du virus chez les individus atteints.

#### 2.2.4. Modes de transmission du virus de l'hépatite C

Le VHC tout comme le VIH et le VHB se transmet par voie parentérale. En ce sens, le principal facteur de risque en Amérique du Nord est l'utilisation de seringues usagées. Actuellement, la transmission du VHC lors de transfusion sanguine et d'hémodialyse est relativement faible mais plusieurs autres activités sont à risque tels que le tatouage, l'inhalation nasale de cocaïne à l'aide de paille et le rasage avec une lame (Tuminelli *et al.*, 1995). Contrairement aux VIH et VHB, le VHC est très rarement transmis lors de relations sexuelles. En effet, des études portant sur la transmission du virus entre conjoints ayant des relations non protégées sur de longues périodes révèlent que le taux de transmission est inférieur à 5% (Nakashima *et al.*, 1995; Osmond *et al.*, 1993). Également, une étude très récente du «Center for disease control» (CDC) américain présenté lors du sixième symposium international sur le VHC et les virus liés (Bethesda, MA, 1999) a démontré que la prévalence chez 1000 prostituées ayant eu en moyenne 2000 relations sexuelles par année, est de 6 à 8%. La transmission verticale du virus (de la mère à l'enfant) est inférieur à 6% pour le VHC et ce, même si le virus peut se trouver occasionnellement dans le lait maternel des femmes ayant une charge virale très élevée (Zimmermann *et al.*, 1995; Polywka *et al.*, 1999). Ces études suggèrent que les risques de transmission verticale et horizontale du VHC sont minimes pour les personnes n'ayant aucun contact direct avec le sang d'individus infectés.

## 2.3. Epidémiologie

### 2.3.1. Distribution mondiale du virus

On estime que 1 à 3% (70 à 210 millions d'individus) de la population mondiale possède des anticorps contre le virus. Ces données sont basées principalement sur la prévalence observée chez les donneurs de sang. Malheureusement, peu de données épidémiologiques sont disponibles pour les pays en voie de développement. Il est donc certain que la prévalence réelle est sous-estimée. La figure 1 indique la prévalence pour les différentes régions du globe selon les données du «Center for Disease Control» américain pour 1997. Il est étonnant de constater que certains pays comme l'Égypte, la Mongolie et la Bolivie ont une prévalence très élevée. En Égypte où plusieurs études sur le sujet ont été effectuées, la prévalence du VHC varie selon les régions entre 14 et 27%. Au Canada, la prévalence du VHC est relativement stable et est inférieure à 1%.

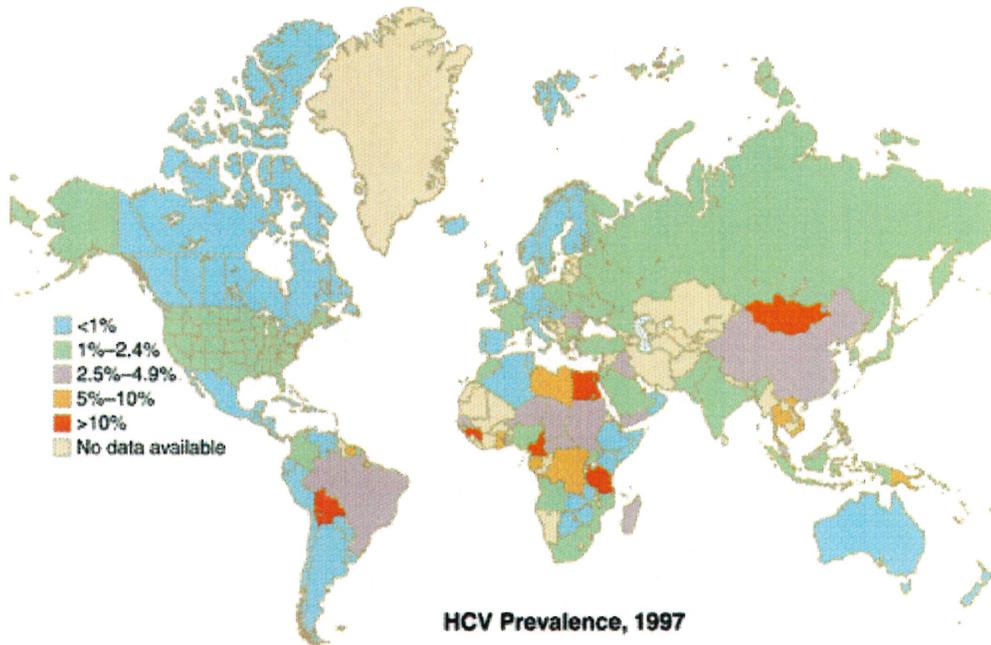


Figure 1. Prévalence du VHC dans le monde. Basé sur les données compilées par le «Center for Disease Control» pour l'année 1997. Tiré de: Cohen, J. (1999). Science 285:26-30.

### 2.3.2. Génotype

En l'état actuel des connaissances, il existe six génotypes distincts du VHC (1 à 6) et chacun de ces génotypes est subdivisé en sous-types (exemple: 1a, 1b, 1c). Le classement des différents isolats dans les différents génotypes se fait par l'analyse de la séquence nucléotidique du génome viral. Ainsi, les membres d'un même sous-type ont une homologie de séquence supérieure à 80% et les génotypes ont en moyenne 60% d'homologie entre eux. Les génotypes 1 et 2 sont présents dans presque toutes les régions du globe. Plus de 40% des individus infectés par le VHC dans le monde possèdent le génotype 1. Malheureusement, ce génotype répond moins bien que les

autres aux traitements à l'interféron. Les génotypes 4 et 5 sont presque exclusivement africains et le génotype 6 se retrouve uniquement en Asie du sud-est. Le génotype 3 se retrouve principalement dans certains pays d'orient et chez les toxicomanes d'occident.

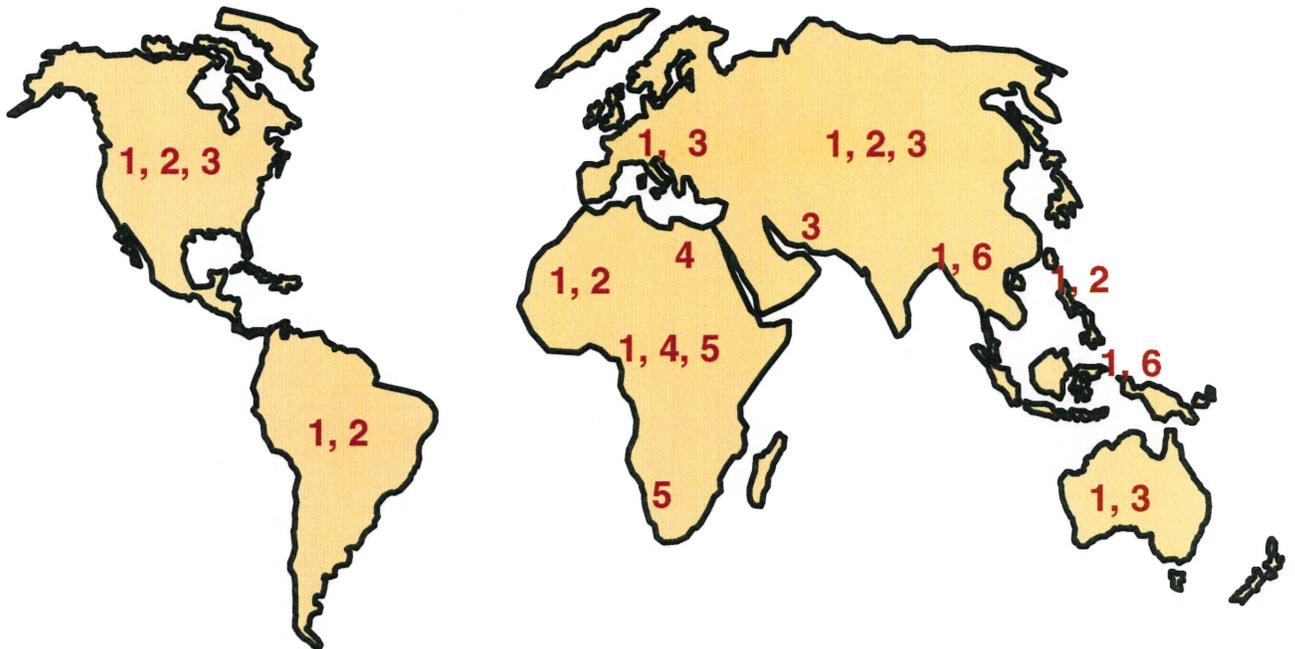


Figure 2. Distribution mondiale des différents génotypes du VHC.

### 2.3.3. Quasi-espèces du virus

Le VHC mute beaucoup en raison du manque de fidélité de l'ARN polymérase virale. De ce fait, chez chaque individu infecté, il existe une grande diversité génomique du même génotype viral. Ces variations génomiques donnent naissance à des quasi-espèces du virus. Bien que les mutations se produisent sur toute la longueur du génome virale, une région à l'intérieur de la protéine d'enveloppe E2 est sujette à un nombre élevé de

mutation et est dite "région hyper-variable". Plusieurs études suggèrent que les quasi-espèces ainsi générées permettraient au virus d'échapper à la surveillance du système immunitaire (Farci et al., 1992; Kato et al., 1993; Wilson et al., 1995; Wyatt et al., 1998). En effet, tout comme le VIH qui produit continuellement des mutants dans la boucle 3 de la protéine d'enveloppe (gp120) pour échapper à la réponse immunitaire (Kliks et al., 1993; Di Marzo Veronese et al., 1993; Schreiber et al., 1997), on pense que le VHC réussit à échapper à la surveillance immunitaire en modifiant les épitopes immunodominants présents au sein de la protéine de surface E2. Ce sujet sera abordé de nouveau dans la section sur la réponse immunitaire humorale (section 2.9.1.)

#### 2.4. Morphologie du virus

La faible charge virale observée dans le sang des individus infectés rend la détection du VHC par microscopie électronique très difficile. Très peu de photographies du virus ont été prises et on désigne encore les particules observées comme étant «HCV-like». En effet, jusqu'à présent, aucun marquage spécifique du virus n'a été réalisé sur des échantillons sanguins et visualisé en microscopie électronique pour ainsi définitivement identifier le virus (ex. marquage des protéines virales à l'aide d'anticorps couplés à de l'or

colloïdal). Par contre Shimizu et al., en 1996 ont réussi à montrer des particules virales intracellulaires de 50 nm marquées avec des anticorps dirigés contre la protéine de la nucléocapside du VHC. Des études de filtration réalisées en 1987 ont permis d'évaluer la taille du VHC entre 30 et 60 nm ce qui correspond à la taille des flavivirus tels que le virus de la diarrhée bovine viral (BVDV) et le virus de la fièvre jaune (YF) (He et al., 1987). La purification du virus par gradient de densité ne permettait pas l'isolement d'une quantité suffisante de virus pour le visualiser, c'est pourquoi l'identification des particules virales sur les différentes fractions du gradient de densité a été réalisée par RT-PCR. Ces mesures ont permis de localiser le VHC à deux densités différentes soit 1.09 et 1.17 g/l (Hijikata et al., 1993a). Des études ultérieures ont démontré que le virus présent dans la bande de faible densité se retrouve co-purifié avec les lipoprotéines de faible densité «Low-density Lipoprotein» (LDL) (Thomssen et al., 1993; Prince et al., 1996). Jusqu'à tout récemment, la signification de cette association entre le virus et les LDL était inconnue. Ce n'est que récemment qu'il a été suggéré que les LDL agissent comme agent de liaison entre le virus et la cellule par la fixation du complexe VHC-LDL au récepteur du LDL présent en grande quantité à la surface des cellules hépatiques (Agnello et al., 1999). Par ce mécanisme, le VHC est internalisé dans la cellule sans interaction spécifique entre les protéines virales et un récepteur cellulaire.

## 2.5. Structure du génome du virus de l'hépatite C

Le VHC possède un génome de polarité positive d'une longueur légèrement variable se situant près des 9600 nucléotides. Le génome du VHC peut être divisé en trois régions soit la région non-codante en 5' (5'-RNC), la région codante et la région non-codante en 3' (3'-RNC).

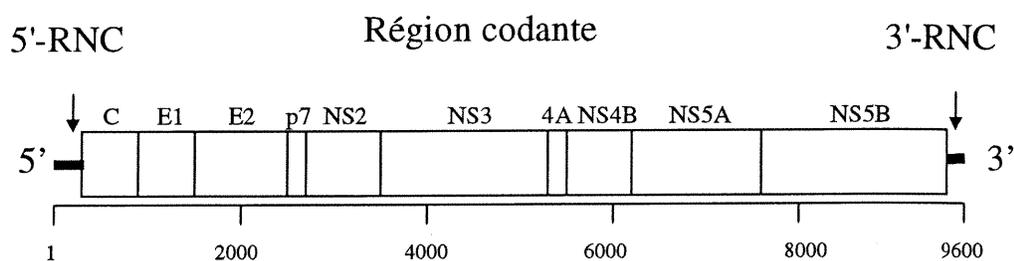


Figure 3. Organisation du génome du VHC. Le génome du VHC est divisé en trois régions. La région codante donne naissance à 10 protéines virales distinctes identifiées par des rectangles ouverts. Les lignes en gras de part et d'autre de la région codante indiquent les deux régions non-codantes «non coding region» (RNC) situées en 5' et en 3' du génome viral. L'échelle située sous la carte génomique du VHC indique la longueur en nucléotides.

Le 5'-RNC du VHC comprend 341 nucléotides formant une structure secondaire comprenant quatre domaines structuraux distincts. (figure 4) Les domaines II, III et IV du 5'-RNC sont essentiels pour la traduction de l'ARN viral. En effet, ces domaines permettent la fixation de la sous-unité 40S du ribosome directement sur l'ARN viral (Bredenbeek, 1996). Cette fonction est

appelée « Internal Ribosome Entry Site » (IRES) et est présente chez d'autres virus tels les picornavirus et les pestivirus (Jackson et Kaminski, 1995; Poole et al., 1995).

La région codante de l'ARN du VHC contient un seul et unique cadre de lecture ouvert de 9 030 à 9 099 nucléotides qui est traduit en une polyprotéine de 3 010 à 3 033 acides aminés (Choo et al., 1991; Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Le clivage enzymatique de la polyprotéine du VHC produit un minimum de 10 protéines virales. Les trois protéines structurales du virus (C, E1 et E2) sont localisées dans le premier tiers de la polyprotéine. Les deux derniers tiers de la polyprotéines renferment les protéines non-structurales du VHC (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Pour plus de détails sur le clivage protéolytique de la polyprotéine virale et sur les fonctions de chacune des protéines, voir la section 2.6.2 et 2.7.



L'organisation et la structure de la 3'-RNC du VHC unique aux VHC. Cette région peut être divisée en trois segments formant une structure secondaire stable (voir figure 5). Le premier segment du 3'RNC est constitué d'une séquence variable de 50 nucléotides. Le deuxième segment est de longueur variable et il est formé d'une répétition d'uridines contenant également quelques cytidines. Finalement, la 3'RNC est formé d'une séquence de 98 nucléotides qui est conservée entre les différents génotypes (Tanaka et al., 1995; Kolykhalov et al., 1996). Jusqu'à présent, aucune séquence de polyadénylation n'a été observée à l'extrémité 3' du génome viral. Le génome viral se termine par une région non-codante (3'RNC) de longueur variable. La 3'RNC du VHC est probablement impliquée dans la réplication de l'ARN viral puisqu'elle interagit spécifiquement avec l'ARN polymérase ARN dépendant du virus (Cheng et al., 1999) et que l'absence de cette structure secondaire empêche la réplication du virus *in vivo* (Yanagi et al., 1999a). De plus, la 3' RNC est impliquée dans la régulation de la traduction (Ito et al., 1998).

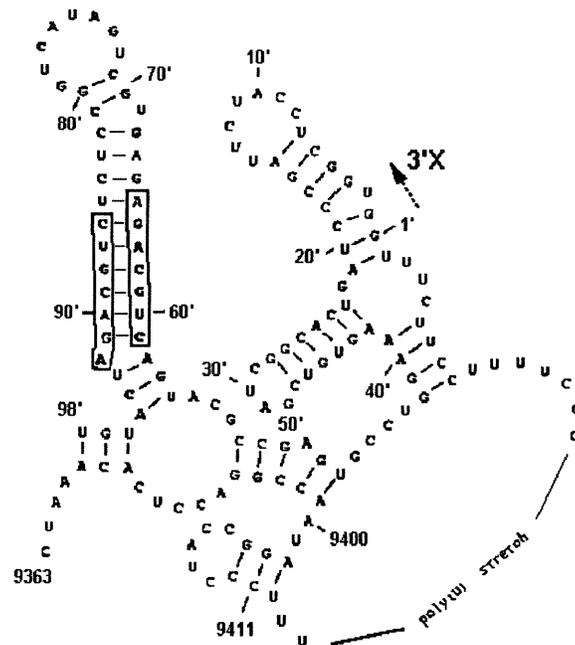


Figure 5. Structure secondaire de la région non-codante en 3' de l'ARN du VHC de génotype 1b.

### 2.5.1. Comparaison avec les flavivirus.

L'organisation du génome de tous les membres des Flaviridae est très similaire. En effet, le génome viral des membres des Flaviridae possède toujours une région non-codante en 3' et en 5' de l'ARN génomique. De plus, le premier tiers de la région codante contient les gènes codant pour les protéines structurales du virion et les deux derniers tiers renferment les gènes des protéines non-structurales. Dans la figure 6, un prototype des flavivirus

(YF) (Rice et al., 1985; Schlesinger et Schlesinger, 1990), des pestivirus (BVDV) (Collett et al., 1988; Xu et al., 1997) et des hépacivirus (VHC) (Takamizawa et al., 1991) est illustré. Également inclus dans la figure 6, les virus GBV-B et VHG, deux membres de la famille des Flaviviridae qui n'ont pas encore été catégorisés à l'intérieur de la famille virale (Muerhoff et al., 1995; Leary et al., 1996; Sbardellati et al., 1999).

La comparaison des séquences en acides aminés des différents membres des Flaviviridae permet de constater que le VHC se situe à égale distance des flavivirus et des pestivirus et ce bien que l'organisation et le mode de réplication du VHC ressemblent davantage à celui des pestivirus (tableau 1). De plus, il faut noter que les trois virus nouvellement identifiés soit GBV-A, GBV-B et VHG sont philogénétiquement plus proches des hépacivirus que des pestivirus ou des flavivirus. Finalement le GBV-A dont le tropisme d'espèces n'a pas encore été confirmé, partage 48% d'identité avec le virus humain de l'hépatite G.

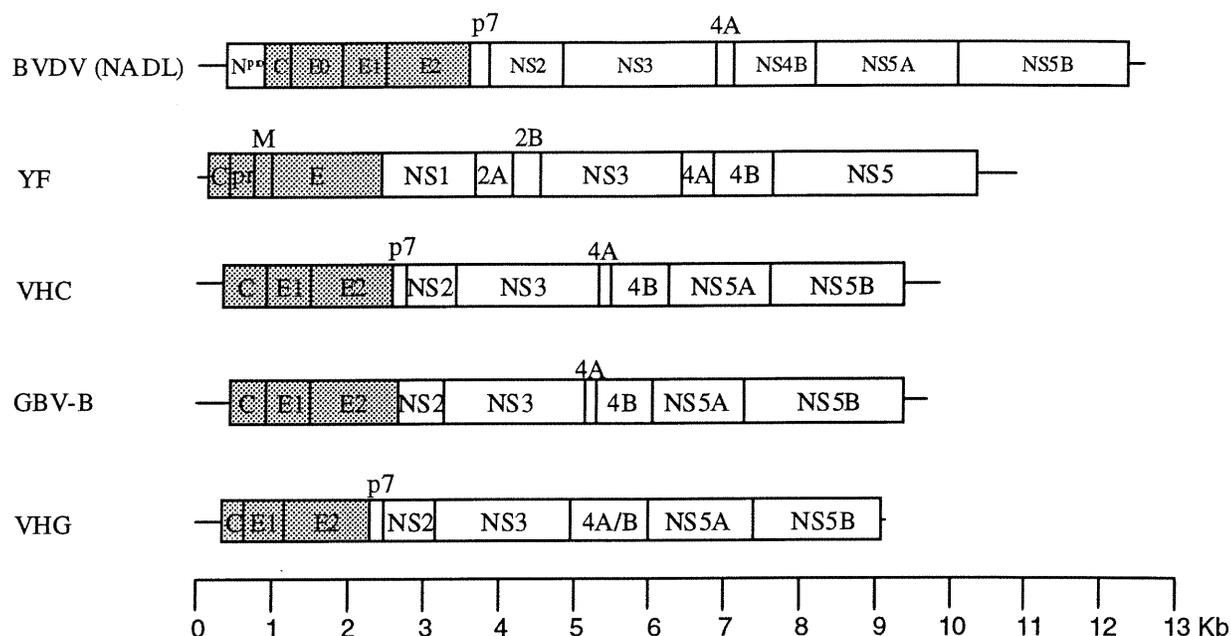


Figure 6. Organisation du génome des Flaviviridae. La position et la taille des protéines structurales (gris) et non-structurales (blanc) sont indiquées. Les lignes en N et C terminal des cadres de lecture ouverts désignent respectivement, le 5'-RNC et le 3'-RNC des virus. La région hachurée en blanc représente la présumée protéine de la nucléocapside du VHG. BVDV, «Bovine viral diarrhea virus» virus de la diarrhée bovine virale; YF, «Yellow fever» virus de la fièvre jaune; VHC, virus de l'hépatite C; GBV-B, virus B de l'agent infectieux GB; VHG, virus de l'hépatite G.

Tableau 1. Pourcentage d'identité entre la séquence complète des cadres de lectures ouverts des divers membres des Flaviviridae.

Virus	Identité %									
	VHC						BVDV	YF	GBV-A	GBV-B
	1a	1b	2a	2b	3a	3b				
VHC 1b	85									
VHC 2a	72	72								
VHC 2b	72	71	84							
VHC 3a	74	75	84	70						
VHC 3b	74	73	69	69	84					
BVDV	21	21	21	21	21	21				
YF	20	18	21	21	20	19	19			
GBV-A	26	31	28	28	26	27	20	19		
GBV-B	32	27	33	33	31	31	22	19	27	
VHG	29	29							48	28

L'identité entre les différentes séquences a été calculée en utilisant le programme informatique «Wisconsin Sequence Analysis Package GAP».

Modifié de: Muerhoff et al., (1995) J. Virol. 69:5621-5630.

## 2.6. Traduction de l'ARN viral.

### 2.6.1. La fonction «IRES»

La traduction de l'ARNm du VHC en protéines se fait par un mécanisme différent de celui décrit par Marilyn Kozak (Kozak, 1989). Ce mécanisme appelé «the scanning model» suggère que la sous-unité 40S du ribosome transportant l'ARN de transfert d'initiation (ARNt-Met) se lie à l'extrémité 5' de l'ARN et se déplace le long de l'ARN de façon rectiligne jusqu'au premier

codon d'initiation de la traduction AUG. Puis, la sous-unité ribosomale 60S se joint à la sous-unité 40S pour ensuite former le premier lien peptidique (Cigan et al., 1988; Kozak, 1989; Kozak, 1991). Comme nous l'avons mentionné dans la section 2.5., la région 5'RNC du VHC contient une structure secondaire stable et conservée entre les différents génotypes viraux. Cette structure secondaire permet la fixation de la sous-unité 40S du ribosome directement sur l'ARN viral. Cette fonction présente chez certains virus est appelée fonction IRES pour «Internal Ribosome Entry Site» et fut observée pour la première fois chez les picornavirus (Perez-Bercoff, 1982; Pelletier et Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988). Chez les picornavirus, la fonction IRES permet au virus de produire ses protéines en très grande quantité au détriment des protéines cellulaires dont la synthèse est réprimée.

La fonction IRES du VHC a été identifiée en 1992 (Tsukiyama-Kohara et al., 1992) et comprend les domaines II à IV de la région 5'RNC et probablement les premiers nucléotides immédiatement après le codon d'initiation AUG (Honda et al., 1996; Reynolds et al., 1995; Rijnbrand et al., 1995; Wang et al., 1995; Honda et al., 1999a). La fonction IRES est un avantage pour les virus car elle permet la synthèse des protéines virales en l'absence de la majorité des protéines cellulaires normalement nécessaires pour la synthèse des protéines de l'hôte. En effet, une traduction minimale des protéines du VHC est obtenue *in vitro* simplement par l'ajout de l'ARNm viral, des facteurs d'initiation eIF2 et eIF3, du GTP, de l'ARN de transfert d'initiation et des sous-unités ribosomale 40S et 60S (Pestova et al., 1998; Sizova et al., 1998). Par

contre, plusieurs protéines cellulaires semblent être impliquées dans la régulation de la traduction du VHC. En effet, la région 5'RNC du VHC contient un minimum de trois sites de fixation pour la protéine PTB «Polypyrimidine Tract-Binding protein» (Ali et Siddiqui, 1995). La protéine PTB augmente le niveau de traduction des protéines virales tout comme la fixation sur le IRES d'une protéine inconnue de 25 kilodalton (Fukushi et al., 1997). Récemment, une augmentation du niveau de traduction a également été observée suite à l'interaction de la protéine HnRNP-L «Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein L» avec la région en bordure 3' du IRES (Hahm et al., 1998). De plus, la fixation de l'antigène «La» sur l'ARNm aux abords du codon d'initiation AUG stimule la fonction IRES (Ali et Siddiqui, 1997). Cette imitation de la traduction peut être spécifiquement inhibée par l'ajout d'un fragment d'ARN de levure appelé I-RNA (Das et al., 1998).

La fonction IRES est également modulée par des composantes du virus lui-même. En effet, il a été démontré que la région 3'RNC du VHC stimule par un facteur de cinq le niveau de traduction et ainsi la production des protéines virales (Ito et al., 1998). Cette activation de la fonction IRES est probablement induite par un rapprochement des régions 5'RNC et 3'RNC du virus. Ce rapprochement pourrait être occasionné par la protéine PTB qui peut se lier indépendamment au 5' et 3' RNC du virus (Ito et al., 1998; Tsuchihara et al., 1997; Ito et Lai, 1999). De plus, des régions régulatrices sont situées à l'extérieur du IRES et plus précisément dans la région codante de la protéine de la nucléocapside. Elles semblent réduire l'activité IRES, ce

qui pourraient expliquer les différences observées au niveau de la traduction du génome viral entre les différents génotypes du VHC (Honda et al., 1999b). De plus, la nucléocapside du VHC régule négativement la traduction de l'ARN viral. Cette inhibition est fonction de la concentration de la protéine et est produite par la fixation de Core sur la région 5'RNC de l'ARN de polarité positive du virus (Shimoike et al., 1999).

### 2.6.2. Clivage protéolytique de la polyprotéine virale

Suite à la synthèse de la polyprotéine virale, celle-ci sera clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales pour former un minimum de dix protéines distinctes. Dans l'ordre, les protéines sont NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Grakoui et al., 1993a; Bartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1994a). La figure 7 résume la spécificité enzymatique ainsi que le clivage séquentiel de la polyprotéine en fonction du temps.

#### 2.6.2.1. Clivage des protéines structurales

Les protéines structurales (C, E1 et E2) situées en N-terminal de la polyprotéine sont clivées co-traductionnellement. Le clivage est effectué par des protéases cellulaires puisqu'il s'effectue lorsque la polyprotéine est mise

en présence d'extraits de membrane de microsome (Hijikata et al., 1991a). En effet, le clivage aux sites C/E1 et E1/E2 est si rapide qu'aucun intermédiaire non-clivé n'est observé lors de traduction *in vitro*. Deux sites de clivages en C-terminal de la protéine C ont été identifiés et donnent naissance à une protéine tronquée de 19 kDa (aa 1-173) et à la forme complète de 21 kDa (aa 1-191) (Santolini et al., 1994; Hüseyin et al., 1996; Liu et al., 1997; Yasui et al., 1998). La séparation de la protéine E2 de la polyprotéine est plus complexe, plus lente et donne lieu à deux intermédiaires E2-p7-NS2 (aa 384-1026) et E2-P7 (aa 384-809) *in vitro* et *in vivo* (Grakoui et al., 1993a; Mizushima et al., 1994; Selby et al., 1994; Lin et al., 1994a).

#### 2.6.2.2. Clivage des protéines non-structurales

À l'exception de la petite protéine p7 qui est clivée par une protéase cellulaire, toutes les protéines non-structurales sont clivées par l'une des deux protéases virales (Cpro-1 ou NS2-3 et Cpro-2 ou NS3). La jonction NS2/3 est clivée par la protéase Cpro-1 qui est en fait une autoprotéase dont l'activité est localisée dans les deux tiers C-terminaux de la NS2 et dans le 1<sup>er</sup> tiers de la protéine NS3 (Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1993b; Pieroni et al., 1997). Le clivage au site NS2/3 par l'autoprotéase Cpro-1 est très rapide et pourrait être co-translationnel. L'activité enzymatique de Cpro-1 est dépendante du zinc, qui en plus d'être un cofacteur, pourrait faire partie de la structure de l'enzyme (Hijikata et al., 1993b; Stempniak et al., 1997).

Le clivage aux sites NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B est réalisé par la protéase virale Cpro-2 localisée dans la partie N-terminal de la protéine NS3 (aa 1-180) (Tomei et al., 1993; Bartenschlager et al., 1993). L'activité de Cpro-2 nécessite la participation de NS4A qui agit comme cofacteur (Lin et Rice, 1995; Hong et al., 1996; Shimizu et al., 1996). Le clivage au site NS3/NS4A est accompli rapidement en *cis* et tous les autres clivages sont en *trans* (Bartenschlager et al., 1994). L'ordre du clivage est le suivant : NS3/NS4A > NS5A/NS5B > NS4A/NS4B > NS4B/NS5A (Bartenschlager et al., 1994; Steinkühler et al., 1996). Pour plus de détails sur la spécificité, la structure et l'activité enzymatique de Cpro-2, voir la section 2.7.2.3.1.

Récemment, le clivage partiel de la protéine NS3 en NS3A (49 kDa) et NS3B (23 kDa) a été observé lorsque la protéine NS3 est exprimée dans des cellules de mammifères et d'insectes (Shoji et al., 1999). Le site du clivage interne de la NS3 est encore incertain mais serait localisé dans le dernier tiers de la protéine ce qui abolirait l'activité hélicase de la protéine.

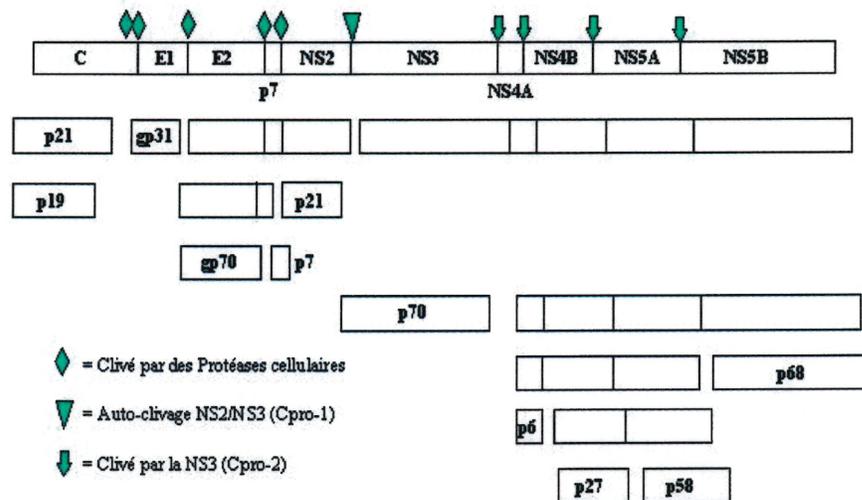


Figure 7. Clivage protéolytique de la polyprotéine du VHC. La masse moléculaire en kilodaltons de chacune des protéines mûres est indiquée dans le rectangle correspondant.

## 2.7. Protéines du virus de l'hépatite C

Puisqu'il n'existe aucun système de réplication permettant l'isolement des particules virales du VHC, l'assignation définitive des protéines faisant réellement partie du virion reste à faire. Pour l'instant, les protéines du VHC sont catégorisées en protéines structurales et non-structurales selon les données connues chez les autres membres des Flaviviridae.

## 2.7.1. Protéines structurales

### 2.7.1.1. Protéine Core (C)

La protéine située en N-terminal de la polyprotéine est hautement basique, multimérisque avec elle-même et est considérée comme étant la constituante majeure de la nucléocapside virale (Santolini et al., 1994; Matsumoto et al., 1996). La production *in vitro* de la protéine Core résulte en une protéine de 21 kDa (p21) clivée après l'acide aminé 191 (Hijikata et al., 1991a). Par contre, lorsque la protéine est produite dans des cellules de mammifères, une seconde protéine de 19 kDa (p19) est observée (aa 1-173) (Lo et al., 1995; Liu et al., 1997; Yasui et al., 1998). Ces deux formes de la protéine C sont cytoplasmiques et probablement associées au réticulum endoplasmique (RE) par les deux régions hautement basiques en C-terminal de la protéine (aa 121-151 et 170-191) (Lo et al., 1995; Yasui et al., 1998). Il est intéressant de noter que lorsque la forme p19 est exprimée seule, sa localisation est alors presque entièrement nucléaire. Il a été suggéré, que la multimérisation de la p21 avec la p19 tôt après la traduction, serait responsable de la localisation cytoplasmique de la p19 lorsque p21 est présente (Liu et al., 1997). Une troisième forme très minoritaire de la protéine C est parfois observée (p16) et est localisée essentiellement dans le noyau des cellules (Lo et al., 1994; Suzuki et al., 1995; Lo et al., 1995). La fonction des deux formes nucléaires de Core est inconnue, mais pourrait intervenir au niveau de la pathogénèse.

Il y a très peu d'informations disponibles sur la morphogénèse du virion, cependant il est fort probable que la protéine Core soit impliquée dans l'encapsidation de l'ARN génomique. En effet, l'interaction spécifique de Core avec le brin d'ARN viral de polarité positive a récemment été démontrée (Shimoike et al., 1999). De plus, Core pourrait être impliqué dans l'initiation du bourgeonnement viral qui a lieu à la surface du RE car Core interagit avec la portion C-terminal de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (Lo et al., 1996).

La protéine C est multifonctionnelle et est impliquée dans diverses fonctions régulatrices. Notamment, elle semble participer dans le processus de cancérisation *in vitro* et *in vivo*. En effet, Core a la capacité de transformer des cellules primaires en cellules tumorigéniques avec ou sans la coopération de l'oncogène *ras* (Ray et al., 1996a; Chang et al., 1998). Chez la souris transgénique exprimant la protéine Core, on observe la formation d'une stéatose hépatique en bas âge et l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire vers le seizième mois de la vie (Moriya et al., 1997; Moriya et al., 1998). Core peut également stimuler ou inhiber l'apoptose (Ray et al., 1996b; Ruggieri et al., 1997; Zhu et al., 1998; Ray et al., 1998; Marusawa et al., 1999), activer ou supprimer l'expression de gènes viraux et cellulaires (Ray et al., 1995; Shih et al., 1995; Srinivas et al., 1996; Ray et al., 1997), activer par contact direct l'activité de l'anti-oncogène P53 (Lu et al., 1999), promouvoir ou supprimer l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Marusawa et al.,

1999; You et al., 1999; Shrivastava et al., 1998) et activer la transcription de AP-1 via les voies métaboliques de JNK et MAPK (Shrivastava et al., 1998). De plus, des souris Balb/c inoculées avec la protéine Core subissent une immunosuppression de la réponse cellulaire (Large et al., 1999).

#### 2.7.1.2. Les protéines d'enveloppe (E1 et E2)

Les protéines E1 et E2 sont les deux protéines d'enveloppe du VHC. Ces protéines membranaires de type I sont ancrées à la membrane par leurs portions C-terminales. Le profil d'hydrophilicité des protéines E1 et E2 démontre que E1 est une protéine hydrophobe qui possède deux régions transmembranaires et un court domaine cytoplasmique. Au contraire, E2 est plutôt hydrophile et possède une seule région transmembranaire avec un domaine cytoplasmique. Les glycoprotéines E1 (gp35) et E2 (gp70) contiennent respectivement 5/6 et 11 sites de N-glycosylations (Miyamura et Matsuura, 1993). La glycosylation de ces protéines compte pour plus que 40% de leur masse car avant glycosylation, E1 (aa 192-382) et E2 (aa 383-745) ont une masse moléculaire de 20 kDa et 40 kDa, (Dubuisson et al., 1994; Matsuura et al., 1994). La glycosylation de E1 et E2 est de type manose puisque celle-ci est inhibée par la tunicamicine qui empêche les glycosylations de type mannose. En plus des glycosylations, les protéines E1 et E2 possèdent des ponts disulfure intramoléculaires (Dubuisson et Rice, 1996).

Plusieurs études montrent que la majorité des protéines E1 et E2 se retrouve sous forme d'hétérodimère (E1E2) lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules de mammifères ou d'insectes (Dubuisson et al., 1994; Ralston et al., 1993; Matsuura *et al.*, 1994; Landford *et al.*, 1993). Deux formes d'hétérodimère de E1E2 sont alors observées. La forme majoritaire contient des ponts disulfures intermoléculaires qui lient les deux protéines par des liens covalents (Deleersnyder et al., 1997). L'hétérodimère E1E2 lié de façon covalente n'est probablement pas incorporé dans le virion car il forme des agrégats *in vivo* (Grakoui et al., 1993a; Dubuisson et al., 1994). La deuxième forme hétérodimérique de E1E2 s'assemble grâce à des liens non-covalents et ce complexe est reconnu par les anticorps présents dans les sérums de patients positifs pour le VHC (Chien et al., 1993; Dubuisson et al., 1994). Le processus de maturation des protéines E1 et E2 s'effectue entièrement à l'intérieur du RE car les deux protéines contiennent un signal de rétention situé en C-terminal qui empêche leurs migrations vers le golgi (Duvet et al., 1998; Cocquerel et al., 1998; Cocquerel et al., 1999; ; Flint et McKeating, 1999). Étant donné la présence de signaux de rétention, les protéines E1 et E2 seules ou sous la forme d'un complexe E1E2 ne peuvent atteindre la membrane cellulaire.

La formation du complexe E1E2 lié de façon non-covalente est très lente ( $t_{1/2} > 2$  h). Le facteur limitant pour la formation du complexe semble être l'ajout des ponts disulfures intramoléculaires de E1 ( $t_{1/2} > 1$  h) (Choukhi et al., 1998).

De plus, le bon repliement de E1 et E2 nécessite l'aide de la protéine chaperonne calnexine qui agit selectivement sur les glycoprotéines présentes dans le RE. Afin d'interagir avec la calnexine, les oligosaccharides présents sur E1 et E2 sont nécessaires et essentiels au bon repliement des protéines et du complexe. Les chaperonnes calreticuline et Bip interagissent également avec E1 et E2 mais sont associées à la formation d'agrégats de E1E2 (Choukhi et al., 1998). Finalement, le bon repliement de la protéine E1 nécessite la présence de E2, ce qui suggère que E2 a une fonction de chaperonne lors de la maturation de E1 (Michalak et al., 1997).

La forme liée de façon non covalente de E1E2 est probablement celle qui se retrouve à la surface du virion. Cependant, il est possible qu'une forme homopolymérique de E2 liée par des ponts disulfures intra- et intermoléculaires soit présente à la surface du virus car 90% des sérums de patients positifs pour le VHC reconnaissent ce complexe (Lee et al., 1997). Puisque la maturation de E1 nécessite l'aide directe de E2, il est peu probable que E1 soit exposée seule à la surface du virion. Le rôle de E1 et E2 lors de l'infection a été analysé en partie en utilisant un virus chimère dérivé du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). La protéine d'enveloppe G du VSV, indispensable pour l'infectivité de la souche sauvage du virus, a été remplacée par la protéine E1 ou E2 du VHC (Lagging et al., 1998). Cette étude a montré que chacune des deux protéines de l'enveloppe du VHC a la capacité de restaurer le potentiel infectieux du virus chimère VSV/VHC. Ceci indique que E1 et E2 interagissent avec un ou des récepteurs présents à la

surface de la cellule cible. Depuis 1996, la fixation spécifique de la protéine E2 à la membrane cellulaire est connue (Rosa et al., 1996). Deux années plus tard, la molécule responsable de l'attachement de E2 à la surface cellulaire observée par Rosa en 1996 a été identifiée comme étant la protéine CD81 (Pireli et al., 1998). Membre de la famille des récepteurs des tétraspanines, CD81 traverse la membrane quatre fois et contient deux domaines extracellulaires (EC1 et EC2). CD81 est une protéine exprimée à la surface d'une grande variété de types cellulaires, incluant les hépatocytes et est toujours associée à une autre protéine (la protéine associée à CD81 varie selon le type cellulaire) pour former un hétérodimère (Levy et al., 1998). L'interaction entre E2 et CD81 se fait au niveau du domaine EC2 de CD81 et des acides aminés 480-493 et 544-551 de E2 (Pireli et al., 1998; Flint et al., 1999b). Il semble que le niveau de fixation de E2 à la surface cellulaire est proportionnel au niveau d'expression de CD81 (Flint et al., 1999b). Malheureusement, les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que la présence de CD81 à la surface cellulaire n'est pas suffisante ou même nécessaire pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Pireli et al., 1998; Flint et al., 1999b; Agnello et al., 1999).

Peu d'études ont été réalisées sur la protéine E1 jusqu'à présent. Si la protéine E1 présente actuellement peu d'intérêt, c'est parce que les anticorps qui neutralisent le virus sont dirigés contre la protéine E2 (Farci et al., 1996; Kojima et al., et al., 1994; Shimizu et al., 1994; Shimizu et al., 1996;

Van Doorn et al., 1995). Dans ce contexte, aucun récepteur potentiel pour E1 n'a encore été rapporté.

La protéine E2 contient deux régions dont la séquence en acides aminés est très variable dans le temps à l'intérieur d'un même individu. Ces séquences sont appelées régions hypervariables (RHV1 et RHV2) et sont à l'origine des différentes quasiespèces retrouvées chez les individus infectés (Hijikata et al., 1991b; Kato et al., 1992; Kato et al., 1994). Les anticorps neutralisants dirigés principalement contre la RHV1 du virus (Watanabe et al., 1999; van Doorn et al., 1995), ne suffisent pas à protéger les chimpanzés contre une réinfection avec l'inoculum de départ (Wyatt et al., 1998; Kao et al., 1996). Il a été suggéré que la pression immunitaire dirigée contre la RHV1 induit la production de mutants de E2 qui ne sont plus reconnus par le système immunitaire ce qui permet au virus de persister dans l'organisme en dépit de la réponse immune (Weiner et al., 1992; Gretch et al., 1996). Pour plus de détails sur la réponse immunitaire dirigée contre les protéines d'enveloppe du virus, voir la section 2.9.

Les virus développent au cours de leur évolution des mécanismes pour inhiber ou contourner certaines fonctions de la cellule. L'une de ces fonctions qui est fréquemment ciblée par les virus est la réponse antivirale induite par l'interféron (Mathews, 1996). L'interféron produit par les cellules agit généralement en activant la transcription de plusieurs gènes antiviraux dont celui de la protéine kinase-R (PKR). L'activation de la PKR lors d'une

infection virale mène normalement à la mort de la cellule infectée suite à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires. Pour éviter cette réponse antivirale, les protéines E2 et NS5A du VHC se lient directement à la protéine PKR et inhibent ainsi sa fonction antivirale (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999). En effet, E2 contient une séquence de 12 acides aminés (aa 276-287) qui imitent la séquence du PKR et du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ . Ainsi E2 se lie à PKR, probablement au niveau du RE, et empêche la liaison PKR-eIF2 $\alpha$ . La comparaison de la séquence correspondant à cette région de la protéine E2 chez les différents génotypes du VHC montre que les génotypes viraux qui résistent aux traitements à l'interféron (1a et 1b) ont davantage d'homologies avec la séquence du PKR et du eIF2 $\alpha$  que celle provenant de génotype sensible au traitement à l'interféron (2a, 2b et 3a) (Taylor et al., 1999).

La protéine E2 existe également sous deux formes minoritaires (E2/p7 et E2/p7/NS2). Ces deux formes de E2 sont plus ou moins stables et résultent d'un clivage post-traductionnel inefficace des jonctions E2/p7 et p7/NS2 (Grakoui et al., 1993a; Mizushima et al., 1994; Selby et al., 1994; Lin et al., 1994a). Le rôle de ces deux formes transitoires de E2 dans la réplication du virus reste inconnu.

## 2.7.2. Protéines non-structurales

### 2.7.2.1. La protéine non-structurale p7

La protéine p7 (7 kDa) résulte d'un clivage facultatif en C-terminal de la protéine E2 (Lin et al., 1994a). Cette protéine p7 est également produite par certains membres des pestivirus tel BVDV et CSF «Classical swine fever virus». Il est fort probable que la protéine p7 du VHC soit non-structurale puisque, chez les pestivirus, elle ne semble pas s'incorporer dans le virion (Elbers et al., 1996). Chez le VHG, la protéine p7 n'a pas encore été identifiée bien que les sites de clivages E2/p7 et p7/NS2 soient présents (Leary et al., 1996). Tant chez les pestivirus que chez le VHC, aucune fonction n'a encore été attribuée à la protéine p7.

### 2.7.2.2. La protéine non-structurale NS2

La NS2 du VHC est une protéine transmembranaire de 21 kDa de masse moléculaire dont la partie C-terminale se retrouve dans la lumière du RE et sa partie N-terminale dans le cytoplasme (Santolini et al., 1995). Chez les Flavivirus, le clivage à la jonction NS2/NS3 s'effectue par la fonction sérine protéase de la NS3. Or dans le cas du VHC, l'abolition de l'activité de la NS3 par mutagenèse dirigée n'affecte en rien le clivage NS2/NS3 (Hijikata et al., 1993b; Grakoui et al., 1993b). Le clivage de la jonction NS2/NS3 se fait par

une protéase (Cpro-1) dont l'activité est délimitée par les acides aminés 849-1237 de la polyprotéine (Santolini et al., 1995). Cette région comprend la majeure partie de la NS2 et tout le domaine sérine protéase en N-terminal de la NS3. Puisqu'il s'agit d'un clivage autocatalytique, l'activité de la Cpro-1 s'effectue en *cis* (Grakoui et al., 1993b). Toutefois, l'ajout en *trans* de la NS2 et de la NS3 permet le clivage du site NS2/NS3, ce qui suggère que Cpro-1 est divisée en deux domaines distincts (Reed et al., 1995). La Cpro-1 ne partage aucune homologie avec les protéases connues mais, puisque l'activité enzymatique est inhibée par l'EDTA et est activée par le zinc, elle fut classée dans la famille des métalloprotéases (Pieroni et al., 1997; Hijikata et al., 1993b). L'activité catalytique *in vitro* de Cpro-1 est augmentée par l'ajout de membranes de microsomes (Pieroni et al., 1997). Compte tenu du caractère très hydrophobe de la protéine NS2, il a été suggéré que la présence de membranes stabilise la protéine NS2 et optimise le bon repliement de celle-ci. Suite au clivage de la jonction NS2/NS3, la protéine NS2 s'ancre dans la membrane cellulaire (Santolini et al., 1995; Pieroni et al., 1997). Des analyses de mutagenèses dirigées autour du site de clivage NS2/NS3 ont permis de démontrer que Cpro-1 est très tolérante aux substitutions situées dans la région P5 à P3' du substrat (Hirowatari et al., 1993; Reed et al., 1995).

Il est peu probable que la seule fonction de la NS2 soit de s'autocliver du reste de la polyprotéine. Bien que la NS2 soit directement impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Liu et al., 1999), la fonction

exacte de la protéine NS2 est encore inconnue,. L'immunoprécipitation de la NS2 à l'aide d'anticorps anti-E1 et anti-E2 suggère qu'il y a formation de complexes NS2-protéines d'enveloppes (Matsuura et al., 1994).

### 2.7.2.3. La protéine non-structurale NS3

La NS3 est certainement la protéine la plus étudiée du VHC puisque trois activités enzymatiques distinctes lui ont été attribuées. En effet, NS3 possède une activité serine protéase dans le premier tiers en N-terminal, une activité hélicase située dans les deux tiers en C-terminal et une activité NTPase à l'extrémité C-terminale de la protéine. Comme l'activité NTPase est une sous fonction de l'activité hélicase, les deux activités seront discutées dans la section décrivant l'activité hélicase.

#### 2.7.2.3.1. Activité sérine protéase (Cpro-2)

L'activité enzymatique de Cpro-2 est localisée dans les 180 acides aminés en N-terminal de la NS3 (Bartenschlager et al., 1993; Eckart et al., 1993; Tomei et al., 1993). L'alignement de la séquence de la NS3 du VHC avec celles d'autres Flaviviridae a permis d'identifier les acides aminés conservés et de localiser la triade catalytique de l'enzyme (His-53, Asp-77 et Ser-138) (Tomei et al 1993). Cpro-2 est responsable du clivage des jonctions NS3/NS4A,

NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B de la polyprotéine virale (voir la section 2.6.2.2.). Le clivage des jonctions NS3/NS4A et NS4B/NS5A par Cpro-2 requiert la présence de la protéine virale NS4A. La présence de la protéine NS4A permet également une augmentation significative de l'efficacité du clivage aux jonctions NS4A/NS4B et NS5A/NS5B (Tanji et al., 1995a; Lin et al., 1994b; Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1994; Failla et al., 1995). Des analyses plus approfondies ont permis d'identifier les acides aminés 21-32 de la NS4A comme étant suffisants pour l'activation de Cpro-2 (Koch et al., 1996; Lin et al., 1995; Shimizu et al., 1996a). À l'intérieur de la cellule, NS3 et NS4A s'associent par des liens non covalents pour former un hétérodimère très stable (Sato et al., 1995; Lin et al., 1995). La faculté qu'a la NS4A de se lier avec la NS3 indique que la NS4A est une composante intégrale de la NS3 et sert probablement à stabiliser le domaine protéase de la NS3 (Kim et al., 1996; Yan et al., 1998). La structure tridimensionnelle du domaine protéase de la NS3 a permis de montrer que Cpro-2 adopte un repliement similaire à la chymotrypsine avec un site tétraédrique à l'extérieur du site actif utilisé pour la fixation d'un atome métallique, probablement du zinc (Love et al., 1996; Kim et al., 1996; Yan et al., 1998). La présence du zinc pourrait avoir un rôle crucial pour le maintien de la structure de la protéine car la mutation des sites de fixation de l'atome de zinc (Cys-97, Cys-99, Cys-145 et His-149) inhibe entièrement l'activité protéolytique de l'enzyme (Stempniak et al., 1997; Urbani et al., 1998). La figure 8 illustre la cristallographie au rayon X du domaine protéase de la NS3 couplée avec le polypeptide NS4A. Comme l'illustre la structure

tridimensionnelle, la NS4A est située à l'extérieur du site actif et semble stabiliser la partie N-terminale de la NS3 grâce à des ponts hydrogènes entre la NS4A et le feuillet bêta en N-terminal de la protéine (Kim et al., 1996).

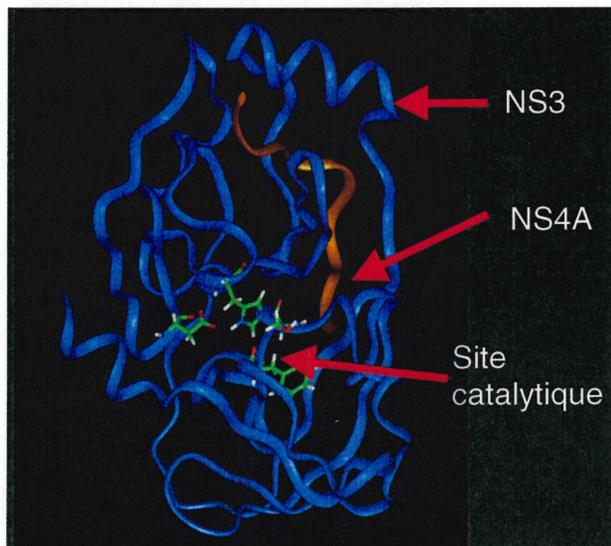


Figure 8. Structure tridimensionnelle du domaine protéase de la NS3 couplée au cofacteur NS4A. En bleu, chaîne polypeptidique du domaine protéase de la NS3 (aa 2-180 de NS3). En orange, chaîne polypeptidique du domaine nécessaire pour l'activation de l'activité Cpro-2 (aa 21-39 de NS4A). La structure des acides aminés de la triade catalytique du site actif est indiquée en vert et rouge (His-53, Asp-77 et Ser-138). Tiré de: Kim et al., (1996). Cell 87:343-355.

Contrairement à Cpro-1, Cpro-2 est moins tolérante aux substitutions entourant les sites de clivages (Figure 9). Il est intéressant de constater que le site de clivage coupé en *cis* (NS3/NS4A) contient une thréonine en P1 alors que tous les sites clivés en *trans* par Cpro-2 ont une cystéine à cette position. L'analyse des différents sites de clivage reconnus par Cpro-2 a permis d'identifier les résidus en P6, P1 et P1' comme étant essentiels pour une protéolyse efficace. De plus, la séquence consensus Asp/GluX<sub>4</sub>Cys/Thr-Ser/Ala a été identifiée (Grakoui et al., 1993c; Kolykhalov et al., 1994; Steinkuhler et al., 1996).

	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'	P8'	P9'
<u>NS3/4A</u>	T	C	M	S	A	D	L	E	V	V	T	S	T	W	V	L	V	G	G	V
	A	C	M	S	A	D	L	E	V	V	T	S	T	W	V	L	V	G	G	V
	T	C	M	Q	A	D	L	E	V	M	T	S	T	W	V	L	A	G	G	V
	T	C	M	Q	A	D	L	E	I	M	T	S	S	W	V	L	A	G	G	V
<u>NS4A/4B</u>	L	Y	R	E	F	D	E	M	E	E	C	S	Q	H	L	P	Y	I	E	Q
	L	Y	Q	E	F	D	E	M	E	E	C	S	Q	H	L	P	Y	I	E	Q
	L	Y	Q	E	F	D	E	M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y	I	E	Q
	L	Y	R	E	F	D	E	M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y	I	E	Q
	L	Y	E	A	F	D	E	M	E	E	C	A	S	K	A	A	L	I	E	E
<u>NS4B/5A</u>	Q	W	I	S	S	E	C	T	T	P	C	S	G	S	W	L	R	D	I	W
	Q	W	I	N	E	D	C	S	T	P	C	S	G	S	W	L	K	D	V	W
	Q	W	I	N	E	D	C	S	T	P	C	S	G	S	W	L	R	D	V	W
	A	W	I	T	E	D	C	P	Y	P	C	S	G	S	W	L	Q	D	I	W
	N	W	I	T	E	D	C	P	I	P	C	S	G	S	W	L	R	D	V	W
<u>NS5A/5B</u>	S	E	A	N	A	E	D	V	V	C	C	S	M	S	Y	S	W	T	G	A
	S	G	A	D	T	E	D	V	V	C	C	S	M	S	Y	S	W	T	G	A
	G	E	A	-	G	E	D	V	V	C	C	S	M	S	Y	T	W	T	G	A
	G	E	A	-	S	D	D	I	V	C	C	S	M	S	Y	T	W	T	G	A
	E	E	A	-	S	E	D	V	V	C	C	S	M	S	Y	T	W	T	G	A
	E	E	A	-	G	E	D	V	V	C	C	S	M	S	Y	T	W	T	G	A

Figure 9. Sites de clivages reconnus par Cpro-2. Représentation des différences observées entre les résidus P11-P9' de différents isolats du VHC. Le site de clivage reconnu par Cpro-2 est situé entre les résidus P1 et P1'. Modifié de: Clarke (1997). J. Gen. Virol. 78:2397-2410.

### 2.7.2.3.2. Activité hélicase

Les hélicases sont des enzymes capables de séparer les brins d'un duplexe ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de nucléosides 5'-triphosphates (NTP) (Lohman et Bjornson, 1996). Plus de 200 hélicases ont jusqu'à présent été identifiées et celles-ci sont impliquées dans une multitude de fonctions associées à l'ADN (réplication, réparation et recombinaison) et à l'ARN (transcription, épissage, transport et initiation de la traduction) (Lohman et al., 1996; Lüking et al., 1998; Matson et al., 1994).

L'alignement de séquences provenant de la NS3 des Flaviviridae montre que la NS3 du VHC contient plusieurs motifs qui sont généralement conservés chez les hélicases (Suzich et al., 1993; Gorbalenya et Koonin, 1993). L'activité hélicase de la NS3 située dans les 465 acides aminés en C-terminal de la protéine NS3 comprend également une activité NTPase (Kim et al., 1995; Jin et Peterson, 1995). L'activité hélicase de la protéine NS3 permet la séparation des duplexes d'ARN, d'ADN et même les hétéroduplexes ADN/ARN dans la direction 3' vers 5' en utilisant comme énergie les nucléosides triphosphates (NTP ou dNTP) (Gwack et al., 1996; Gwack et al., 1997; Tai et al., 1996). La caractérisation détaillée de l'activité enzymatique de l'hélicase du VHC ainsi que la structure tridimensionnelle ont

été récemment rapportées (Porter, 1998a; Porter, 1998b; Porter et al., 1998; Kim et al., 1998; Yao et al., 1997).

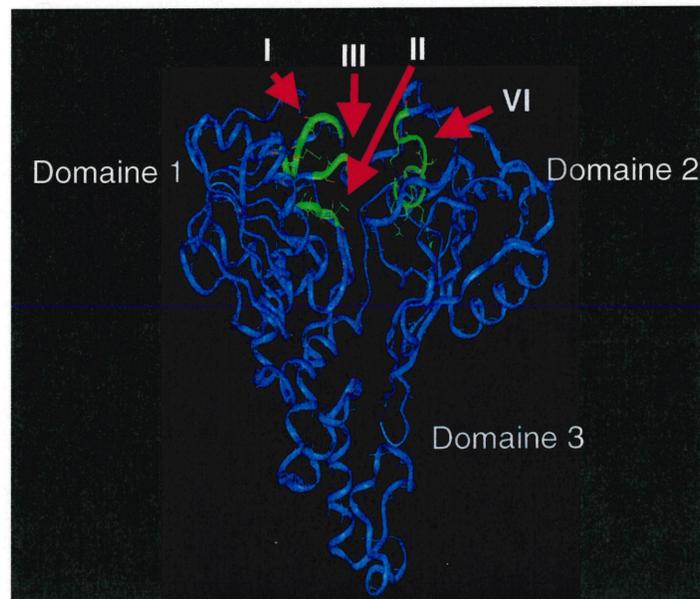


Figure 10. Structure tridimensionnelle de la portion hélicase de la NS3. Les trois domaines de l'hélicase sont identifiés. Certains des motifs conservés entre les différentes hélicases sont indiqués en chiffre romain (I, GSGKT; II, DExH; III, TAT; VI, QRxGRxGR). Modifié de: Kim et al., (1998). Structure 6:89-100.

Tous les motifs conservés entre les différentes hélicases, dont le motifs II (DExH) responsable de la liaison au complexe ATP-Mg<sup>2+</sup>, se trouvent dans les domaines 1 et 2, et ce principalement le long de la fente séparant ces

deux domaines (Figure 10). Ces motifs situés le long de la fente sont indispensables pour l'activité hélicase car ils interagissent soit avec l'ATP ou avec le  $Mg^{2+}$  et permettent le déplacement de l'hélicase dans la direction 3' vers -5' (Lin et Kim., 1999). Le mécanisme suggéré pour la séparation d'un duplexe d'ARN par l'hélicase du VHC est illustré dans la figure 11.

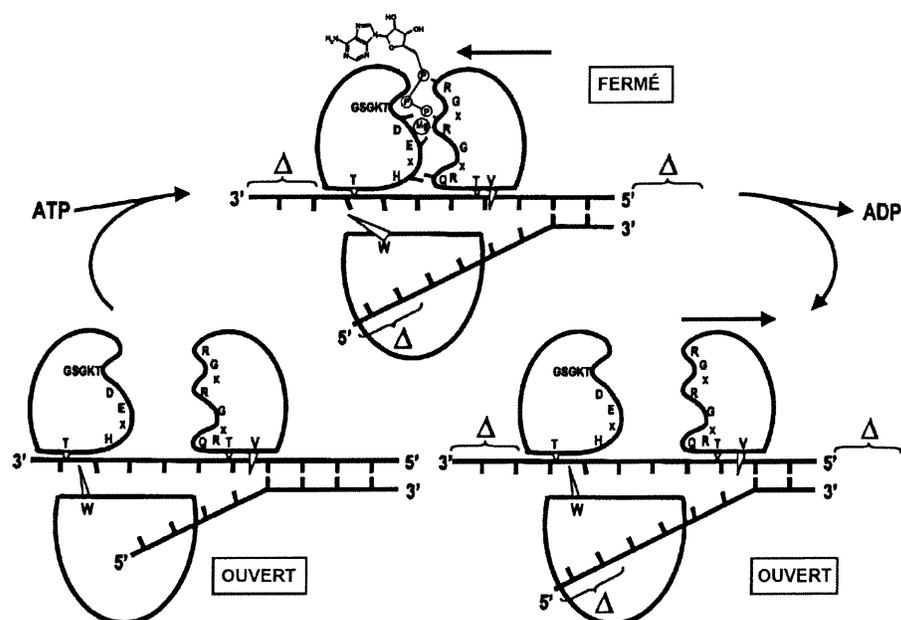


Figure 11. Mécanisme proposé pour la séparation des brins d'ARN par l'hélicase du VHC. Les trois domaines de l'hélicase sont montrés dans la même orientation que dans la figure 10. Les motifs I (GSGKT), II (DEXH) et VI (QRxGRxGR) ainsi que les quatre acides aminés conservés (Thr-269 du domaine 1, Thr-411 et Val-432 du domaine 2, et Trp-501 du domaine 3) importants pour l'activité hélicase sont indiqués. (En bas à gauche) En absence d'ATP, l'hélicase du VHC adopte une conformation ouverte où les régions d'interactions entre les domaines 1 et 2 sont distantes. Suite à la

fixation de l'ATP, le domaine 2 se rapproche des domaines 1 et 3 dû aux interactions entre l'ATP-Mg<sup>2+</sup> et les domaines I, II et VI. La formation de cette configuration fermée résulte en le déplacement des domaines 1 et 3 le long des chaînes liées dans la direction 3'- vers -5' ce qui entraîne simultanément l'ouverture d'un certain nombre de paire de base. Après le mouvement des domaines 1 et 3 et suite à l'hydrolyse de l'ATP, le domaine 2 se déplace vers sa droite pour restaurer la configuration ouverte de l'hélicase. Tiré de: Lin et Kim, (1999). J. Virol. 73:8798-8807.

En plus de ces activités enzymatiques, la protéine NS3 aurait un certain potentiel oncogénique car elle induit la transformation des cellules NIH 3T3 *in vitro* (Sakamuro et al., 1995). La protéine NS3 est aussi l'une des composantes d'un complexe NS3-NS5A formé en *cis* lors du clivage de la polyprotéine. Ce complexe est nécessaire pour l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Neddermann et al., 1999; Koch et Bartenschlager, 1999).

#### 2.7.2.4. La protéine non-structurale NS4A

Comme nous venons de le voir dans la section précédente, la protéine NS4A de 6 kDa de masse moléculaire est une composante intégrante de la protéine NS3 et est nécessaire pour le clivage des jonctions reconnues par Cpro-2 (pour plus de détail, voir la section 2.7.2.3.1.). En plus d'agir comme co-facteur de Cpro-2, la protéine NS4A pourrait permettre d'ancrer le complexe

NS3/NS4A au niveau du RE là où le clivage protéolytique a lieu. En effet, en raison du profil très hydrophobe de la NS4A, il a été suggéré et partiellement démontré que cette protéine affecte la localisation cellulaire de la protéine NS3 (Muramatsu et al., 1997; Kim et al., 1999).

La protéine NS4A interagit non seulement avec la protéine NS3 mais également avec les protéines virales NS4B et NS5A (Lin et al., 1997). Son implication directe dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A est bien connue (Kaneko et al., 1994; Tanji et al., 1995b; Asabe et al., 1997). Des rapports récents suggèrent que l'hyperphosphorylation de la NS5A ne nécessite pas uniquement la NS4A mais qu'elle requiert la formation d'un complexe protéique comprenant les protéines virales NS2/NS3/NS4A/NS4B/NS5A (Koch et Bartenschlager, 1999; Neddermann et al., 1999; Liu et al., 1999).

#### 2.7.2.5. La protéine non-structurale NS4B

Aucun rôle n'a été assigné à cette protéine hydrophobe de 27 kDa de masse moléculaire. Lorsque la NS4B est exprimée en fusion avec la protéine fluorescente GFP «Green Fluorescent Protein», la protéine NS4B se retrouve dispersée dans tout le cytoplasme et apparaît sous la forme de centaines de petites masses granulaires (Kim et al., 1999). Par contre, lorsque la NS4B est exprimée avec les autres protéines non structurales du VHC, elle co-

sédimente avec les membranes et pourrait faire partie d'un complexe protéique impliqué dans la réplication du virus (Hijikata et al., 1993c; Rice, 1996).

#### 2.7.2.6. La protéine non-structurale NS5A

La protéine NS5A est une phosphoprotéine présente sous deux isoformes, une forme de base p56 (56 kDa) et une forme hyperphosphorylée p58 (58 kDa) (Tanji et al., 1995b; Kaneko et al., 1994). La phosphorylation de la NS5A s'effectue principalement sur les résidus sérines mais quelques résidus thréonine sont également phosphorylés (Tanji et al., 1995b; Reed et al., 1997). La phosphorylation de la p56 s'effectue sur des résidus situés entre les acides aminés 2200-2250 et dans la région à l'extrémité C-terminale de la NS5A alors que l'hyperphosphorylation s'effectue sur les sérines 2197, 2201 et 2204 (Tanji et al., 1995b). Bien que la formation de la forme p56 ne nécessite aucune protéine virale, l'hyperphosphorylation de p56 en p58 est un mécanisme complexe qui implique les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B et NS5A du VHC (Liu et al., 1999; Koch, et Bartenshschlager, 1999; Neddermann et al., 1999). Bien que la phosphorylation de la NS5A varie légèrement entre les différents génotypes du VHC, elle est probablement importante pour la réplication du virus puisque la protéine correspondante chez les pestivirus et les flavivirus (NS5A/NS5) est également phosphorylée (Hirota et al., 1999; Reed et al., 1998).

La protéine NS5A possède un signal de localisation nucléaire fonctionnel, situé en C-terminal de la NS5A (nucléotides 2326-2334; PPRKKRTVV) (Ide et al., 1996). Ce signal de localisation nucléaire pourrait permettre à la NS5A, qui est normalement périnucléaire, de traverser la membrane nucléaire pour atteindre le noyau (Tanji et al., 1995b). La régulation de la transcription se fait souvent par phosphorylation de protéines dans le noyau de la cellule, c'est pourquoi il a été suggéré que la NS5A serait un facteur de régulation de la transcription des gènes cellulaires (Chung et al., 1997; Kato et al., 1997 ; Ghosh et al., 1999). En effet, la forme tronquée en N-terminal de la NS5A active la transcription des gènes cellulaires de la levure et de la lignée hépatique Huh-7 (Tanimoto et al., 1997; Kato et al., 1997) alors que la NS5A complète réprime la transcription du facteur p21WAF1 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Ghosh et al., 1999). Puisque la protéine NS5A est observée dans la région périnucléaire tout comme la polymérase virale (NS5B), il est probable que la NS5A soit une composante du complexe de réplication (Tanji et al., 1995b; Hwang et al., 1997; Tu et al., 1999).

En plus de son implication possible dans la réplication du virus, il y a de plus en plus d'évidences indiquant que la NS5A est un facteur influençant la susceptibilité aux traitements à l'interféron. En effet, il a été proposé que la susceptibilité de certains isolats viraux aux traitements à l'interféron entre en corrélation avec des mutations observées au sein de la région délimité par les acides aminés 2209-2248 de la NS5A (Enomoto et al., 1995; Enomoto et al.,

1996). Par la suite, une interaction directe entre la NS5A et la protéine PKR impliquée dans la résistance antiviral à l'interféron a été rapportée (Gale Jr. et al., 1997; Gale Jr. et al., 1998). Par conséquent, la protéine NS5A inhiberait la réponse à l'interféron en se liant aux PKR bloquant ainsi son autophosphorylation et la cascade d'évènements qui normalement mènent à la mort des cellules infectées. Cependant, les études sur l'inhibition de la réponse à l'interféron par la NS5A sont nombreuses et restent controversées. En effet, certains rapports démontrent que la réponse à l'interféron observée chez les patients est fonction de la séquence interne de la NS5A (Saiz et al., 1998; Enomoto et al., 1996), mais d'autres rapports n'ont pas réussi à établir cette corrélation (Komatsu et al., 1997; Pawlotsky et al., 1998; Chung et al., 1999). Il semble que la fonction anti-interféron de la NS5A ne soit pas présente chez tous les génotypes du virus. En fait, la fonction anti-interféron de la NS5A est très variable selon les génotypes et même selon les isolats d'un même génotype (Saiz et al., 1998; Pawlotsky et al., 1998; Magrin et al., 1998; Hofgärtner et al., 1997; Polyak et al., 1998).

#### 2.7.2.7. La protéine non-structurale NS5B

La séquence correspondant à la protéine NS5B du VHC est conservée parmi les protéines des Flaviviridae et contient des régions homologues au poliovirus et au virus de la mosaïque du tabac (Kamer et Argos, 1984). Toutes ces séquences contiennent le motif GDD caractéristique du site actif

des ARN polymérase ARN dépendante. La production de l'ARN génomique du VHC implique la formation d'un brin d'ARN complémentaire qui servira de matrice à la formation de l'ARN génomique de polarité positive. Pour ce faire, la polymérase du VHC doit initier la réplication de l'ARN viral de polarité négative et positive à partir de l'extrémité 3' de ceux-ci. Bien que la NS5B soit responsable de la réplication de l'ARN viral, le mécanisme précis utilisé par l'enzyme pour reconnaître et répliquer spécifiquement l'ARN du virus est inconnu.

La protéine NS5B de 68 kDa de masse moléculaire est une phosphoprotéine associée aux membranes et localisée principalement dans la région périnucléaire (Hwang et al., 1997). L'activité polymérase de la NS5B a été caractérisée en utilisant une protéine recombinante exprimée d'abord chez les cellules d'insectes (Behrens et al., 1996; Lohmann et al., 1997) puis chez la bactérie (Yuan et al., 1997, Yamashita et al., 1998; Oh et al., 1999). L'activité de la polymérase nécessite absolument la présence d'un ion divalent tel que  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (Lohmann et al., 1998). En plus de l'activité polymérase, la protéine NS5B possède une activité terminal transférase qui permet l'ajout de quelques nucléotides à l'extrémité de l'ARN (Behrens et al., 1996; Lohman et al., 1997). Les premières études ont montré que la polymérase NS5B peut polymériser l'ARN à partir d'une variété de matrices homopolymériques et hétéropolymériques. La protéine NS5B est capable d'utiliser un mécanisme appelé «copy-back» pour répliquer l'ARN en absence d'amorce (Behrens et al., 1996; Lohman et al., 1997). Ce mécanisme fait

appel à la formation d'une boucle à l'extrémité 3' de l'ARN qui sert ensuite d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire. Cette boucle peut être formée grâce à une structure secondaire inhérente à l'ARN ou suite à l'ajout de quelques nucléotides par l'activité terminale transférase de la NS5B. Suite à la réplication d'un ARN par le mécanisme de copy-back, l'ARN obtenu est deux fois plus long que la matrice initiale puisque la synthèse est continue à partir de l'extrémité 3' de la matrice. Bien que le mécanisme de «copy-back» soit observé *in vitro*, il implique une perte d'une partie du matériel génétique à chaque cycle de réplication. C'est pourquoi, il est peu probable que ce mécanisme soit utilisé par le virus *in vivo*. En ce sens, une équipe de chercheurs a récemment démontré que la NS5B du VHC est capable de répliquer une matrice hétéropolymérique d'ARN en l'absence d'amorce en utilisant l'extrémité 3' du brin négatif ou positif pour synthétiser le brin complémentaire de même longueur (Oh et al., 1999). Il semble qu'une séquence promotrice est présente à l'extrémité 3' de l'ARN de chacun des brins viraux et que cette séquence est indispensable pour la réplication de l'ARN viral (Oh et al., 1999).

L'expression de la protéine NS5B sous sa forme complète produit une protéine peu soluble et difficile à purifier (Behrens et al., 1996). La délétion des 21 acides aminés en C-terminal de la protéine NS5B augmente la solubilité et préserve l'activité enzymatique de la protéine (Yamashita et al., 1998; Ferrari et al., 1999). En utilisant cette forme soluble de la NS5B, la cristallographie au rayon X a été réalisée simultanément par deux équipes

(Lesburg et al., 1999; Bressanelli et al., 1999). La principale conclusion tirée de ces travaux est que la polymérase du VHC possède tous les motifs caractéristiques aux polymérases mais que la NS5B du VHC semble beaucoup moins flexible que la transcriptase inverse du VIH ou que l'ARN polymérase ARN dépendante du poliovirus. Ainsi, la polymérase aurait la capacité de se déplacer le long de la matrice sans changement conformationnel majeur (Figure 11) (Lesburg et al., 1999). Afin de mieux comprendre la structure globale des polymérases, il faut mentionner que celles-ci adoptent la conformation d'une main. En effet, trois domaines sont toujours observés chez les polymérases soit le pouce (en haut à droite), les doigts, (en haut à gauche) et la paume de la main qui réunit les doigts et le pouce (en bas au centre). La flexibilité de l'enzyme est définie selon le mouvement qui peut être effectué entre le pouce et les doigts (figure 12).

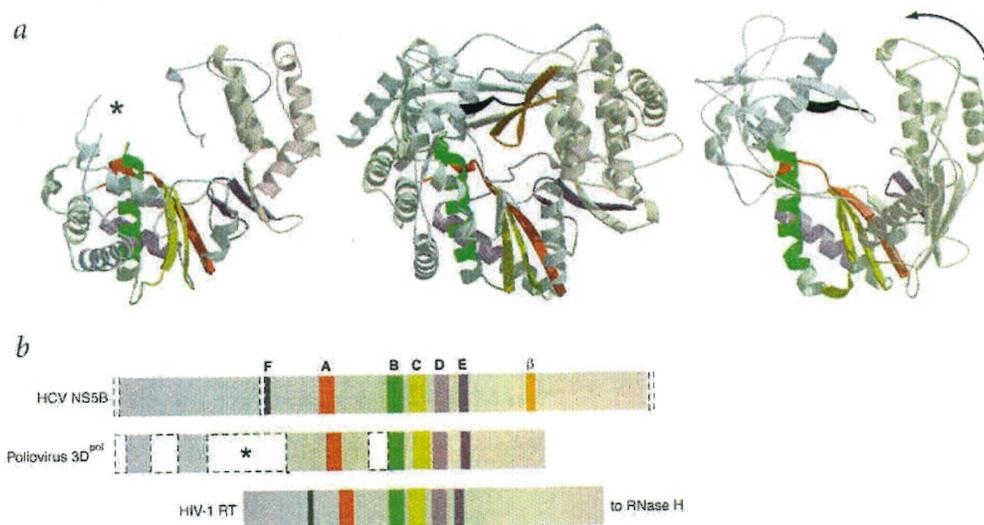


Figure 12. Structure tridimensionnelle de la NS5B du VHC. A; comparaison de la structure de la polymérase du VHC (centre), du poliovirus (gauche) et de la transcriptase inverse du VIH (droite). Les motifs conservés et caractéristiques des polymérases sont indiqués en couleur claire. Le motif (ArgX<sub>n</sub>Leu/Ile) nouvellement identifié et observé chez certaines polymérases tels que la NS5B et la transcriptase inverse du VIH est indiqué en noir. Pour la polymérase du VHC, la boucle-β qui restreint le mouvement entre le domaine des doigts et celui du pouce est indiqué en orange. L'astérisque dénote les acides aminés manquant dans la structure de l'enzyme du poliovirus. La double flèche indique la direction du mouvement effectué par le domaine (pouce) sur la matrice:amorçage liée à l'enzyme du VIH. B; Illustration des motifs conservés observés en A. Les régions absentes de la structure tridimensionnelle sont indiquées par des pointillés. Tiré de: Lesburg et al., (1999). Nat. Struc. Biol. 6:937-943.

## 2.8. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VHC peut-être subdivisé en 9 étapes qui sont: 1, l'attachement du virus à la cellule cible; 2, l'entrée du virus dans la cellule par un mécanisme d'endocytose; 3, la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire; 4, la traduction de l'ARN génomique provenant du virion; 5, la réplication de l'ARN génomique; 6. la traduction de l'ARN génomique en grande quantité; 7, l'assemblage des particules virales; 8, le

transport des virions à la membrane cellulaire; 9, le largage des virions. Un schéma hypothétique du cycle de réplication du VHC est présenté sur la figure 13 p.58.

La fixation du virus à la cellule cible se fait vraisemblablement via les glycoprotéines de surfaces E1 et E2 du VHC assemblées sous la forme d'hétérodimères E1E2. Jusqu'à présent, deux candidats pour le récepteur cellulaire ont été rapportés, soit la molécule CD81 et le récepteur du LDL (LDL-R). Il a été clairement démontré que la présence de la molécule CD81 à la surface cellulaire est suffisante pour l'attachement des particules virales bien que l'entrée du virus via cette interaction ne soit pas établie (Pireli et al., 1998; Flint et al., 1999b). Il est possible que l'entrée du virus nécessite la présence de co-récepteurs autre que le CD81 ou que les essais effectués soient incomplets.

Il semble que le virus utilise un mécanisme indirect pour pénétrer dans la cellule. Ce mécanisme fait appel à la fixation du complexe VHC-LDL au LDL-R. Dans la circulation sanguine, une fraction (plus ou moins grande) du VHC est enveloppée par des lipoprotéines de faible et très faible densité (LDL et VLDL) (Thomssen et al., 1993; Prince et al., 1996). Ce complexe VHC-LDL peut ensuite entrer dans la cellule par endocytose via la fixation du complexe aux récepteurs du LDL. Cette internalisation du virus n'implique aucune interaction entre les glycoprotéines d'enveloppes du virus et un récepteur cellulaire. Ce mécanisme indirect et peu spécifique est également utilisé par d'autres Flaviviridae (BVDV et VHG) (Agnello et al., 1999).

Il est maintenant admis que l'entrée du virus s'effectue comme chez les Flaviviridae, par endocytose du complexe virus-récepteur (Rice et al., 1996; Agnello et al., 1999). Bien qu'il n'existe aucune preuve définitive de l'endocytose du virus, la conformation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 change à pH acide ce qui soutient l'hypothèse d'une endocytose suivie d'une fusion de la membranes virale à pH acide à l'intérieur de la cellule (Flint et al., 1999a).

Suite à l'endocytose, la fusion des membranes virales et cellulaires a lieu, probablement dans les endosomes, suite à l'abaissement du pH par l'entrée d'ion  $H^+$ . Ce mécanisme est commun à plusieurs virus tels que les virus influenza, les alphavirus, les rhabdovirus et les flavivirus. La fusion de la membrane virale permet de libérer la nucléocapside dans le cytoplasme et l'accès de l'ARN génomique aux ribosomes libres. Puisque l'ARN génomique est de polarité positive et qu'il contient une fonction IRES, il se fixe directement sur les ribosomes et sert d'ARNm pour la traduction de la polyprotéine. Suite au clivage de la polyprotéine virale, la polymérase du VHC seule ou possiblement sous la forme d'un complexe de réplication, reconnaît l'extrémité 3' du brin de polarité positive et donne naissance au brin d'ARN de polarité négative. Cet ARN de polarité négative servira alors de matrice pour la synthèse d'une grande quantité d'ARN génomiques. Par la suite, bon nombre de ces ARN génomiques serviront pour la production de polyprotéines virales à la surface du réticulum endoplasmique rugueux.

L'assemblage et la maturation des virions semblent se faire principalement au niveau du RE. Les protéines d'enveloppes E1 et E2 sont exposées dans la lumière du RE grâce à la présence de peptides signaux présents en amont de ces deux protéines. Ces protéines sont ensuite glycosylées dans le RE, mais aucune modification des glycoprotéines du VHC n'a lieu au niveau de l'appareil de Golgi (Dubuisson et Rice, 1996). Un signal de rétention empêche la migration de E1 et E2 vers le Golgi, c'est pourquoi le bourgeonnement du virus s'initie probablement dans le RE (Duvet et al., 1998; Cocquerel et al., 1999). La nucléocapside se forme dans le cytoplasme par l'oligomérisation de core et l'encapsidation de l'ARN de polarité positive (Shimoike et al., 1999). Le bourgeonnement commence suivant l'interaction entre la nucléocapside (via la protéine core) et la glycoprotéine de l'enveloppe E1 (Lo et al., 1996).

Le transport des particules virales vers l'extérieur s'effectue probablement dans des vésicules qui migrent directement du RE vers la membrane cellulaire. La sécrétion des virions matures nécessite la fusion entre la membrane des vésicules de transport et de la membrane cytoplasmique.

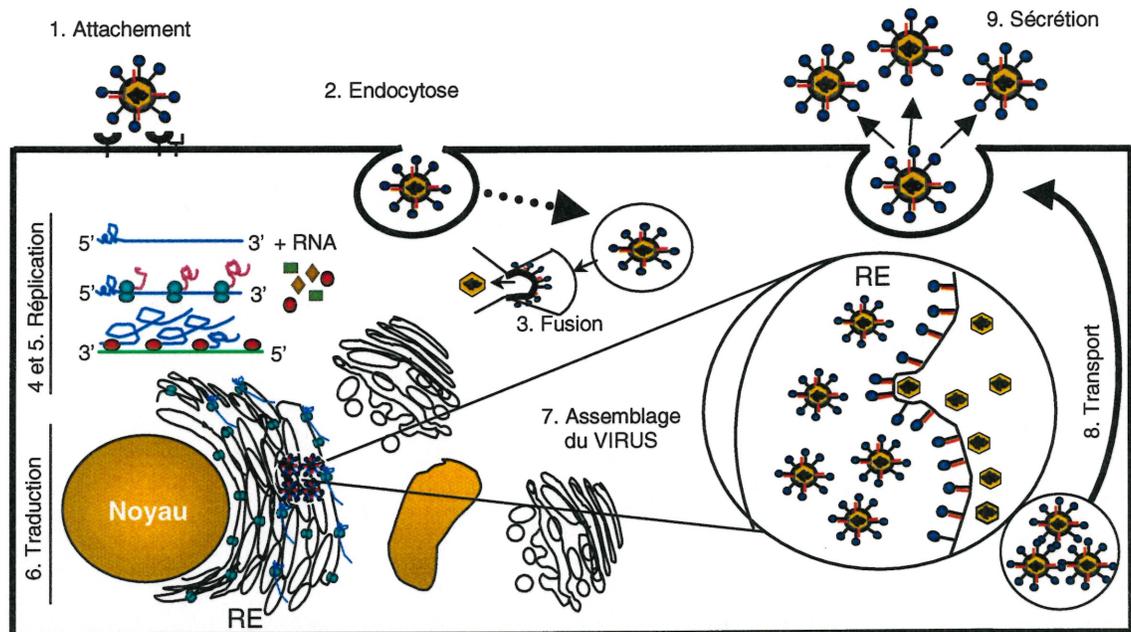


Figure 13. Cycle de réplication du VHC. Trait bleu, ARN de polarité positive. Trait vert, ARN de polarité négative. Duplexe de boules vertes, ribosomes. Sphères rouges, protéine NS5B. Pour plus de détails, voir le texte ci-dessus.

## 2.9. Réponse immunitaire

Fondamentalement, les mécanismes de la réponse immunitaire effectrice peuvent être divisés en deux. La réponse humorale est responsable de l'élimination des pathogènes extracellulaires et l'immunité cellulaire est responsable des pathogènes intracellulaires. La somme des réponses immunitaires humorale et cellulaire qui sont dirigées contre les antigènes viraux est normalement responsable de l'élimination d'un virus. Bien qu'une réponse immunitaire humorale et cellulaire polyclonale et multispécifique soit observée suite à l'infection par le VHC, une infection chronique est observée

dans plus de 80% des cas. Les individus qui ont éliminé le virus lors de la phase aiguë de l'infection ont en général une réponse immunitaire initiale plus forte que ceux ayant développé une infection chronique. La principale différence entre ces deux groupes se situe au niveau de la réponse des lymphocytes T CD4+ auxiliaire. Il est donc possible que l'établissement d'une infection chronique par le VHC soit causé par une réponse immunitaire antivirale trop faible pour permettre l'éradication du virus.

#### 2.9.1. Réponse humorale

Les anticorps produits par la réponse humorale contre le VHC sont facilement détectés par ELISA et sont à la base des tests diagnostics qui ont permis le dépistage du virus (Alter et al., 1989). Suite à l'infection par le VHC, une réponse humorale se développe contre pratiquement toutes les protéines virales. Cependant, les épitopes B dominants sont localisés dans les protéines E2, Core, NS3, NS4 (jonction NS4A/NS4B) et NS5A (Beld et al., 1999; Wienhues et al., 1998; Scarselli et al., 1995; Zibert et al., 1995). De plus, chez les individus infectés de façon chronique, la formation de follicules lymphoïdes intrahépatiques fonctionnels capables d'activer et d'induire la prolifération et la différenciation de lymphocytes B dirigés contre le VHC est observée (Murakami et al., 1999; Bach et al., 1992). Bien que tous les aspects de la réponse humorale soient fonctionnels, celle-ci semble inefficace. Cette inefficacité de la réponse humorale pourrait être liée à la

rapidité avec laquelle le virus modifie ses épitopes immunodominants pour ainsi échapper à la réponse immunitaire. Ce phénomène de mutations des épitopes causé par une pression immunitaire constante et soutenue a été observé chez les protéines E2 et NS3 du VHC (Martell et al., 1992; Weiner et al., 1992; Wang et Eckels, 1999; Eckels et al., 1999).

Les vaccins anti-viraux existants (VHB, influenza, poliovirus etc...) sont tous basés sur l'induction de la réponse humorale et les efforts déployés pour le développement d'un vaccin contre le VHC utilisent aussi cette stratégie. En effet, des anticorps neutralisants induits par la protéine E2 du VHC sont produits (Shimizu et al., 1994a; Farci et al., 1994; Zibert et al., 1995) et sont capables de protéger des chimpanzés non infectés contre l'infection par le VHC (Choo et al., 1994; Farci et al., 1996; Esumi et al., 1999). Néanmoins, ces anticorps neutralisants ne protègent pas les chimpanzés qui ont éliminé le virus contre une réinfection avec une souche virale homologue ou hétérologue (Farci et al., 1992; Farci et al., 1996). L'incapacité des anticorps neutralisants, induits par la protéine E2 et plus précisément la RHV-1, de protéger coïncide avec l'émergence de nouveaux variants de la RHV-1 qui agissent alors comme antagoniste à la prolifération des lymphocytes T auxiliaires (Allander et al., 1997; Kato et al., 1993; Shimizu et al., 1994; Frasca et al., 1999). Néanmoins, il semble exister à l'intérieur de la RHV-1 du VHC une structure conservée capable d'induire des anticorps immunoréactifs contre plusieurs isolats et génotypes (Esumi et al., 1998; Hattori et al., 1998; Zhou et al., 1999). En ce sens, la production d'anticorps

neutralisants réagissant contre un large éventail de souches du VHC pourrait mener au développement d'un éventuel vaccin (Lamonaca et al., 1999).

### 2.9.2. Réponse cellulaire

La réponse immunitaire cellulaire est le principal mécanisme utilisé par l'organisme pour éliminer un virus. Bien que l'organisme produise des lymphocytes T cytotoxiques contre la majorité des protéines virales, ce qui devrait normalement permettre la lyse des cellules infectées et l'élimination complète du virus, il semble que l'immunité cellulaire lors de la phase aiguë de l'infection soit sous optimale et ne permette pas l'élimination du virus (Cerny et Chisari, 1999). En effet, quelques études ont démontré une association directe entre le niveau de cellules CD4+ et la vitesse à éliminer le virus de l'organisme (Missale et al., 1996; Diepolder et al., 1997; Gerlach et al., 1999). L'élimination du virus sera d'autant plus évidente si le profil des cellules CD4+ est de type I (favorise l'immunité cellulaire) (Tsai et al., 1997). Parmi toutes les régions immunogéniques du VHC, la protéine NS3 est celle qui induit le plus haut niveau d'immunité cellulaire et qui est le plus souvent associée avec l'élimination du virus (Diepolder et al., 1997; He et al., 1999). L'immunité cellulaire intrahépatique est fonctionnelle chez les patients et la persistance du VHC dans l'organisme dans ces conditions illustre la flexibilité génétique du virus (Bertoletti et al., 1997; Nelson et al., 1997). Récemment, il a été démontré que le niveau initial de l'interleukin 10 dans le sang

prédispose à l'établissement de l'infection chronique probablement suite à une inhibition partielle de l'immunité cellulaire (Edwards-Smith et al., 1999). Il est possible que le virus facilite l'établissement de la chronicité en modulant la production de certaines cytokines à certains moments précis de l'infection. Malheureusement, l'absence d'un petit model animal permettant la réplication *in vivo* du virus limite énormément la caractérisation de la réponse immunitaire contre le VHC.

#### 2.10. Réplication du virus *in vivo*

Comme nous l'avons mentionné plus tôt dans l'introduction, la seule espèce connue infectée naturellement par le VHC est l'homme. L'infection du chimpanzé par le VHC est artificielle et généralement, elle induit une pathogenèse beaucoup moins sévère que chez l'homme. Le VHC a un tropisme pour le foie et, en conséquence, le virus utilise la circulation sanguine pour se disséminer à travers l'organe. Le foie qui produit environ  $10^{12}$  virions par jour, semble être le seul organe où une réplication active et soutenue du virus s'effectue (Neumann et al., 1998). Des études *in situ* effectuées sur des coupes de foie provenant de patients infectés par le VHC ont démontré la présence du génome et des protéines virales distribuées dans toutes les régions du foie (Walker et al., 1998; Sansonno et al., 1997; Lau et al., 1996; Lau et al., 1994; Horiike et al., 1993), ainsi que dans les régions cancéreuses (Sansonno et al., 1997; Rüster et al., 1996; Horie et al.,

1996). Il semble néanmoins que la réplication du virus soit plus faible dans les régions cancéreuses que dans les régions saines limitrophes (Sansunno et al., 1997; Haruna et al., 1993). La présence du génome viral a également été observée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Afonso et al., 1999; Muratori et al., 1996; Zignego et al., 1992; Zehender et al., 1997), mais il semble que la réplication du virus dans ces cellules soit faible ou inexistante (Lanford et al., 1995; Cribier et al., 1995; Mellor et al., 1998). Finalement, le génome du VHC a été observé sporadiquement dans le pancréas, la glande surrénale, les poumons, la thyroïde, la rate et la moelle osseuse d'individus co-infectés avec le VIH (Laskus et al., 1998a; Laskus et al., 1998b). Il semble que l'immunosuppression engendrée par le VIH induise une l'augmentation de la charge virale du VHC, ce qui permettrait la détection du virus dans des organes normalement non infectés (Sherman et al., 1993).

Actuellement, le seul modèle animal disponible pour étudier la réplication et la pathogenèse du VHC est le chimpanzé. Malheureusement, suite à l'infection par le virus, plus que 60% des chimpanzés réussissent à éliminer complètement le virus. La réponse immunitaire chez le chimpanzé est relativement efficace et est dirigée contre des épitopes différents de ceux observés chez l'homme. En effet, la pression immunitaire sur la RHV-1 est beaucoup moins forte chez le chimpanzé que chez l'humain (Bassett et al., 1998). Malgré ces inconvénients, les chimpanzés sont présentement indispensables pour le développement d'un éventuel vaccin, l'étude de la réponse immunitaire ainsi que pour la caractérisation d'agents antiviraux.

Compte tenu du coût économique très élevé relié à l'achat et à l'entretien de l'animal (plus de 20 000 dollars par animal), l'élaboration d'un petit modèle animal peu coûteux est l'un des enjeux majeurs de la recherche sur le VHC.

Très peu de données ont été communiquées sur l'élaboration d'un modèle animal pour le VHC autre que le chimpanzé. Il existe un petit animal d'Asie du sud-est, nommé musaraigne, qui est susceptible à plusieurs virus humain tels que le rotavirus humain, l'herpes simplex de type 1 et 2, ainsi que les virus des hépatites A, B et D (Zan et al., 1981; Darai et al., 1978; Li et al., 1995; Walter et al., 1996). Récemment, la susceptibilité de la musaraigne «*Tupaia belangeri chinensis*» à l'infection par le VHC a été démontrée (Xie et al., 1998). Les animaux répartis en deux groupes de 23 spécimens ont été infectés avec du sérum humain positif pour le VHC. Les résultats obtenus, basés sur la présence de l'ARN viral détecté par RT-PCR et/ou sur la présence d'anticorps anti-VHC ont démontré que 32% (15/46) des musaraignes ont été testées positives à un certain moment durant les 47 semaines de l'expérience. Le problème majeur est que jamais plus de 13% (6/46) des animaux ont été testés positifs pour un temps donné ce qui rend l'utilisation de cet animal très problématique.

Deux modèles utilisant la souris pour répliquer le VHC ont été rapportés. Le premier de ces deux modèles est basé sur l'implantation d'un morceau de foie humain, positif pour le VHC, directement sous la capsule surrénale de souris immunodéficientes (souris BNX «beige/nude/X-linked

immunodéficient», irradiées et reconstituées avec des cellules de la moelle osseuse de souris SCID) (Galun et al., 1995). Le greffon est alors capable de libérer des particules virales dans la circulation sanguine pour une période de temps qui varie de façon inversement proportionnelle à la détérioration du greffon. Par ce procédé, jusqu'à 50% des souris se sont avérées positives pour le VHC avec un titre de  $10^2$ - $10^3$  copies d'ARN viral/ml de sang. Le deuxième modèle fait appel à l'implantation de cellules hématopoïétiques humaines, positives pour le VHC, dans des souris SCID. Les auteurs ont démontré que 31% (8/26) des souris étaient très faiblement positives pour le VHC et ceci huit semaines après l'implantation (Bronowicki et al., 1998).

### 2.11. Réplication du virus *in vitro*

Depuis l'isolement du virus, plusieurs lignées cellulaires ont été testées pour la réplication du VHC. La majorité de ces lignées sont d'origines hépatiques (Hep-G2, Huh-7, JHH-1, JHH4, JHH6) ou lymphocytaires (Daudi, MT4, MT2C, HPB-Ma10-2) (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1993; Shimizu et Yoshikura, 1994; Seipp et al., 1997; Tsuboi et al., 1996; Nakajima et al., 1996; Shimizu et al., 1998). Malheureusement, la réplication du virus dans ces lignées est très faible, sporadique, fluctue énormément, et est de courte durée, ce qui rend très difficile l'utilisation de ces lignées cellulaires pour étudier les mécanismes de la réplication du virus. Actuellement, les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant des cultures primaires d'hépatocytes

humains infectés par le VHC *in vivo* ou *in vitro* (Iacovacci et al., 1997; Ito et al., 1996; Rumin et al., 1999). Le titre viral obtenu grâce à la culture d'hépatocytes primaires d'origines humaines infectés par le VHC est variable mais peut atteindre jusqu'à  $10^6$  génome équivalent/ml de culture, ce qui est probablement suffisant pour être utilisé comme modèle de réplication. Par contre, il est difficile de maintenir des hépatocytes primaires en culture. De plus, la disponibilité ainsi que la courte durée de vie des hépatocytes *in vitro* rendent ce modèle de réplication peu accessible.

La réalisation d'un clone complet et fonctionnel du VHC avait donné l'espoir qu'un système pour la réplication du virus puisse être produit *in vitro* (Yoo et al., 1995). Depuis, plusieurs transcrits d'ARN génomiques provenant de différents génotypes et sous-génotypes ont été construits et analysés pour leurs potentiels infectieux *in vitro* et *in vivo*. À l'exception d'un clone, tous les ARN génomiques se sont avérés infectieux chez le chimpanzé, mais nullement infectieux en culture cellulaire (Kolykhalov et al., 1997; Yanagi et al., 1997; Dash et al., 1997; Yanagi et al., 1998; Beard et al., 1999; Yanagi et al., 1999b). Cette observation suggère que le faible niveau de réplication du virus observé *in vitro* est probablement causé par l'absence de facteurs présents exclusivement *in vivo* et indispensables pour une réplication active du virus.

Puisque certains facteurs présents uniquement *in vivo* sont nécessaires pour une réplication efficace du virus, Lohmann et al. ont développé un système

de réplication du VHC indépendant des étapes de pénétration, d'encapsidation et de sécrétion du virus (Lohmann et al., 1999). En effet, leur système repose sur la réplication autonome d'un ARN sous génomique (réplicon) contenant la région codant pour les protéines nonstructurales du virus (NS3-NS5B). Afin de forcer la réplication du replicon *in vitro*, un gène de résistance à la néomycine a été inséré dans le replicon et seules les cellules contenant un replicon fonctionnellement actif peuvent survivre. Évidemment, ce modèle ingénieux ne mime qu'une partie du cycle de réplication du virus mais pourrait s'avérer très utile pour la caractérisation d'agents antiviraux spécifiques aux activités enzymatiques du virus.

## 2.12. Problématique

Actuellement, il n'existe aucun système de réplication *in vitro* permettant l'analyse de la réplication du virus et l'évaluation d'agents antiviraux. Bien que plusieurs lignées cellulaires soient permissives au VHC, le titre viral obtenu *in vitro* est très faible et fluctue dans le temps. *In vivo*, la situation n'est guère meilleure puisque, à l'exception du chimpanzé, aucun modèle de réplication prometteur n'a été développé. C'est pourquoi, le développement d'un système de réplication *in vitro* et/ou *in vivo* est une priorité pour toute la communauté scientifique travaillant sur le VHC. Actuellement, l'industrie pharmaceutique développe des agents antiviraux actifs sur les cibles moléculaires du virus. L'absence d'un essai cellulaire empêche la

progression des agents antiviraux prometteurs vers les phases cliniques, ce qui bloque le développement de médicaments. C'est pourquoi, l'élaboration d'un modèle de réplication pour le VHC est un enjeu scientifique, humanitaire et économique des plus importants.

### 2.13. Objectif

Notre objectif est de produire un petit modèle animal peu coûteux pouvant servir à l'étude de la réplication du VHC.

Puisque toutes les lignées cellulaires permissives au VHC supportent faiblement le virus *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que certains facteurs *in vivo* sont nécessaires pour une réplication active du virus. Il est donc possible que l'implantation d'une lignée cellulaire humaine permissive au VHC dans un environnement hépatique puisse mener à la réplication du virus dans l'animal.

Afin de réaliser notre objectif, nous avons séparé notre recherche en deux étapes.

**Première étape:** Produire une tumeur humaine d'origine hépatique dans l'environnement hépatique d'un petit animal (souris Nude).

La réalisation de la première étape est cruciale pour la réalisation du projet. Nous nous devons de trouver une lignée cellulaire permissive au VHC, tumorigénique et idéalement capable de produire de belles tumeurs solides de type carcinome hépatocellulaire dans le foie des souris. Malheureusement, les cellules hépatiques humaines adaptées pour la culture cellulaire sont peu nombreuses et généralement très peu tumorigéniques *in vivo*. De toutes les lignées hépatiques humaines disponibles à l'«American Type Culture Collection» (ATCC), seule les lignées cellulaires Hep-G2, PLC/PRF/5 et Hep-3B sont capables de produire des tumeurs solides *in vivo*. De ces trois lignées cellulaires, les cellules Hep-G2 sont les seules à être négatives pour les protéines du VHB. Par contre, la tumorigénicité des cellules Hep-G2 est controversée puisque certains auteurs réussissent à produire des tumeurs sous-cutané chez des souris immunosupprimés (Grove et al., 1995; Yao et al., 1996; Wang et al., 1990) alors que d'autres n'y parviennent pas ou difficilement (Knowles et al., 1980; Shouval et al., 1988). Puisque les lignées cellulaires d'origines hépatiques humaines ont normalement peu de tumorigéniques, nous avons effectué un sous-clonage de la lignée Huh-7. Cette lignée cellulaire privée est faiblement tumorigénique et semble être permissive au VHC. Suite au sous clonage, nous avons isolé un clone, nommé HuT7-3, beaucoup plus tumorigénique *in vivo* que la lignée parentale Huh-7. L'article 1 décrit en détail la procédure que nous avons suivie afin d'établir et de caractériser une tumeur orthotopique d'origine hépatique humaine chez des souris nude.

**Deuxième étape:** Initier l'infection virale et caractériser la réplication du VHC dans le modèle orthotopique établi à l'étape 1.

L'article 2 décrit les résultats de la réplication du VHC *in vivo* obtenus suite à l'implantation des cellules HuT7-3 infectées directement dans le foie des souris nudes.

## **Article 1**



ELSEVIER

Hepatology Research 18 (2000) 72–85

**Hepatology  
Research**

www.elsevier.com/locate/ihepcom

## Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model

Patrick Labonté<sup>a</sup>, Salam Kadhim<sup>b</sup>, Terry Bowlin<sup>a</sup>,  
Samir Mounir<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> BioChem Pharma Inc., 275 Armand-Frappier Blvd, Laval, Québec, Canada, H7V 4A7

<sup>b</sup> Stressgen Biotechnology Corporation, 120-4243 Glanford Av., Victoria, B.C., Canada, V8Z 4B9

Received 31 May 1999; received in revised form 15 November 1999; accepted 19 November 1999

---

### Abstract

A number of human xenograft orthotopic models of hepatocellular carcinoma (HCC) have been previously established by growing histologically-intact patient specimens in nude mice. However, the availability of HBV and HCV negative human hepatocellular carcinoma specimens is scarce and the pattern of tumor growth in nude mice varies depending on the tumor type. In the present study, we have established a reproducible xenograft orthotopic model using a human HCC cell line designated HuT7-3 that was derived from two rounds of subcloning of the parental Huh-7 cell line. The tumor growth rate of the HuT7-3 cell line, grown at a primary subcutaneous site, was markedly higher than that of the Huh-7 parental cell line or the human hepatoblastoma Hep-G2 cell line. Furthermore, we have shown that doxorubicin, when administered intravenously, is efficient in inhibiting the development of subcutaneous tumor but leads to the regression of the orthotopic human HCC. Consequently, this novel HCC xenograft orthotopic model can be used for the evaluation of antitumor drugs. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Hepatocellular carcinoma; Huh-7; Doxorubicin; Animal model; Antitumoral agent

---

1386-6346/00/\$ - see front matter © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

PII: S1386-6346(99)00087-X

## 1. Introduction

The frequency of hepatocellular carcinoma (HCC) is rapidly increasing throughout the world with an estimated incidence of 300 000 new cases annually [1] and with more than 450 million people infected worldwide with the hepatitis B virus (HBV) or the hepatitis C virus (HCV). Thus, the high incidence of HCC is predicted to be sustained for the next decades [2,3]. Despite the availability of therapeutic approaches for the treatment of HCC which include the use of positron emission tomography and hepatic resection, percutaneous ethanol injection, percutaneous microwave coagulation, or liver transplantation, the high incidence of the tumor recurrence is indicative of the urgent need for new antitumor agents [1,4–9].

Experimental tumor models have been extensively developed for a wide range of human malignancies including cancers of colon, stomach, pancreas, bladder, lung, breast, ovary and prostate [10–17]. The methods of tumor implantation were based on organ colonization following engraftment of either tumor masses or suspensions of human tumor cells in nude mice. The actual orthotopic model for human liver cancer is based on the implantation of histologically intact surgical specimens [18]. The fact that freshly derived HCC specimens are difficult to obtain and each HCC derived cell specimen manifests its own growth characteristics, prompted us to establish an experimental orthotopic HCC model utilizing human cultured cells. A few human hepatoblastoma or HCC-derived cell lines are available for establishment of solid tumors in mice. From the currently available hepatocyte-derived cells such as Hep-3B, PLC/PRF/5 and Hep-G2, only the latter is HBV free and is consequently suitable for the development of an *in vivo* model despite the controversy surrounding the growth capability of Hep-G2. Some reports demonstrate the development of subcutaneous tumor upon injection of Hep-G2 cells [19–21]. Conversely, other investigators have encountered difficulty in demonstrating Hep-G2 tumor establishment, presumably due to clonal cell heterogeneity and the number of injected cells used [22,23]. From our studies, we found that the Hep-G2 cell line was poorly tumorigenic when injected subcutaneously into nude mice, and consequently, was not used for further development.

The human hepatoma cell line Huh-7 is more differentiated than the human hepatoblastoma cells Hep-G2, yet still expresses several hepatic factors and produces subcutaneous solid tumors in athymic mice [24,25]. Therefore, the human hepatoma cell line Huh-7 was selected for the development of xenograft orthotopic HCC in nude mice. After two rounds of cell subcloning, we selected a clone that showed a high degree of tumorigenicity when injected either subcutaneously or orthotopically in nude mice. We provide evidence that both subcutaneous and orthotopic tumors respond well to intravenous injection of doxorubicin, a potent chemotherapeutic agent that is currently used against many types of cancers including HCC [26–28]. Here, we report the development and validation of a new human xenograft orthotopic HCC model that may be used for efficacy evaluation of novel antitumor and therapeutic agents.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The CD-1 nu/nu mice were obtained from Charles River (St-Constant, Québec, Canada) and were housed and treated in agreement with the Canadian Council of Animal Care.

### 2.2. Cells

The kidney 293 and the hepatoblastoma Hep-G2 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The Huh-7 was kindly provided by Dr Masayoshi Namba (Okayama, Japan) and was derived from a 57-year-old patient with HCC [22]. Cells were propagated in Dulbecco's modified Minimum Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. Prior to injection into nude mice, cells were tested for the presence of mycoplasma and rodent viruses.

### 2.3. Subcloning of Huh-7 cells

Huh-7 cells, at confluence growth of 70% in 25 cm<sup>2</sup> flask, were transfected with 2 µg of pOS2 plasmid, obtained from Dr Stanley M. Lemon (Chapel Hill, NC, USA) in the presence of 12 µl of lipofectamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). The pOS2 plasmid contains the T7 RNA polymerase and neomycin resistance genes. Transfected cells were cultured as mentioned above except that 0.6 mg/ml of Geneticin (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) was added to the medium after transfection. At five days post-transfection the cells were trypsinized and divided into 24-well plates at 100 cells/well. Clones that grew in the presence of Geneticin were selected and analyzed for T7 RNA polymerase activity, and then subcloned in 96-well plates at ten cells/well. Some of these clones, designated HuT7 cells, were selected and the T7 RNA polymerase activity as well as tumorigenicity was evaluated and compared with the parental cells.

### 2.4. T7 RNA polymerase assay of HuT7 cells

The T7 RNA polymerase activity was evaluated essentially as described by Fuerst et al. [29]. Briefly,  $3 \times 10^6$  cells were resuspended in 250 µl of 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 10 mM NaCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The cells were then lysed by freeze-thawing and centrifuged 5 min at 12 000 × g. For the T7 RNA polymerase activity, 3 µl of cytoplasmic supernatant were mixed in 25 µl mixture of: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0); 8 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 2 mM spermidine; 30 mM dithiothreitol containing 1 mM of each NTP (CTP, GTP and ATP); 5 µM [<sup>32</sup>P]-UTP; 0.1 µg of linearized pBluescript-KS+ vector (Stratagene, Aurora, Ontario, Canada); 40 U RNasin (Promega, Madison, WI, USA) and incubated for 1 h at 37°C. The labeled RNA was then mixed to 1 ml of ice cold 10%

trichloroacetic acid, incubated on ice for 10 min and applied on GF/C glass filter. The filter was washed extensively with 5 ml of 10% trichloroacetic acid and filter-bound radioactivity was measured in a scintillation counter (Microbeta 1450, Wallac, Turku, Finland). Alternatively, the T7 RNA polymerase activity was measured by transfection of HuT7 cells with the T7DC1-341 plasmid obtained from Dr Aleem Siddiqui (Denver, Colorado, USA). This plasmid contains the luciferase gene under the transcriptional control of the T7 RNA polymerase promoter. Following 24 h post-transfection, the luciferase activity was measured using the LucLite assay as described by the manufacturer (Packard, Meriden, CT, USA).

### 2.5. *Subcutaneous xenograft*

The tumorigenicity of Hep-G2, Huh-7 and HuT7 cell clones was evaluated by inoculating  $5 \times 10^6$  cells subcutaneously into the right flanks of 6–8 week old CD-1 nu/nu mice. Groups of 5–10 mice were used for each cell clone, and the tumor sizes as well as the body weight of mice were evaluated twice a week.

### 2.6. *Orthotopic tumor*

Subcutaneous tumors, obtained from the HuT7-3 clone were digested with 0.1% collagenase type IV; 0.002% deoxyribonuclease type IV and 0.01% hyaluronidase type V (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) in serum-free DMEM for 10 min at 37°C. Cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and plated in complete medium containing 0.6 mg/ml of Geneticin. For intrahepatic injection, the liver was exposed and 50  $\mu$ l of trypsinized HuT7-3 cells ( $5 \times 10^6$ ) were injected intrahepatically via a 27-gauge needle. Three weeks post-inoculation, mice were sacrificed and examined for the presence of orthotopic tumors.

### 2.7. *Cell proliferative status*

Tumor and adjacent non-neoplastic liver tissue as well as a tissue sample of normal human liver were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 25 mM Hepes (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% sodium desoxycholate, 40% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin and adjust to pH 7.5. Tissue homogenates were then centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at 4°C. Supernatants were aliquoted, frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and the protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For the Western blot analysis, 24  $\mu$ g of each sample were resolved through a 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-C, Amersham, Oakville, Ontario, Canada). The resulting membrane was then incubated 30 min in PBS containing 5% nonfat dry milk followed by 1 h at room temperature with a specific mouse monoclonal anti-PCNA antibody (Santa-Cruz, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:1000 in PBS containing 5% nonfat dry milk. Following four washes (of 15 min each) in PBS containing 0.05%

Tween-20, the membrane was incubated in the presence of a horseradish peroxidase-conjugated antibody directed against mouse immunoglobulin (Amersham, Oakville, Ontario, Canada) diluted 1:1000 in PBS containing 5% nonfat dry milk. After four washes (of 10 min each) in PBS containing 0.05% Tween-20, proteins were detected using the ECL protein detection kit (Amersham, Oakville, Ontario, Canada).

### 2.8. *Histological analysis of the organs*

Hearts, lungs, kidneys, spleens and livers from normal and orthotopically implanted mice were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin for histological analysis.

### 2.9. *Direct immunofluorescence*

Cells derived from orthotopic tumors were resuspended and cultured in presence of Geneticin as described above. Three to four days later, cells were trypsinised and seeded on a 12-well multitest slide (ICN, Montréal, Québec, Canada) at  $4 \times 10^4$  cell/well for 24 h. The cells were then fixed for 30 min at  $-20^\circ\text{C}$  in cold acetone, air dried and incubated 2 h in humidified chamber in presence of 25  $\mu\text{l}$ /well of rabbit IgG anti-human albumin fluorescein-isothiocyanate coupled at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Slides were washed three times for 5 min with PBS, once with distilled water, and examined under a fluorescence microscope (Laborlux, Leica, Heerbrugg, Switzerland). The human kidney 293 cells were used in parallel as a negative control.

### 2.10. *In vitro proliferation inhibition of doxorubicin*

Cell proliferation inhibition of HuT7- subclones was assessed by [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation into DNA. Briefly, 2000–3000 cells were seeded into 96-well microtiter plates and cultured at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified incubator. One day later, a ten-fold dilution of doxorubicin was added in quadruplicate to the cell plates. Three days later, 18 kBq of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine was added to each well, and after an additional 18 h of incubation, cells were trypsinized and harvested on a fiberglass filter using a Tomtech 96 harvester (Tomtec, Orange, CT, USA). Harvested plates were then counted in a scintillation counter (Microbeta 1450, Wallac, Turku, Finland). The  $\text{IC}_{50}$  was then calculated as the concentration of doxorubicin that inhibits cell proliferation by 50% of control cells using the GraphPad Prism™ software (GraphPad software Inc, San Diego, CA, USA).

### 2.11. *Evaluation with doxorubicin*

Eight mice were injected subcutaneously and 16 mice intrahepatically with HuT7-3 cells as described above. When subcutaneous tumor volume reached approximately  $80\text{--}100\text{ mm}^3$ , a 10 mg/kg dose of either doxorubicin or saline were

injected intravenously (via tail vein) in a 0.1 ml volume into randomized mice of each group. The second intravenous injection was administered 7 days later. The mice were sacrificed and examined for histopathology when the size of the solid subcutaneous tumors in the control saline-treated group exceeded 500% of the initial tumor volume.

### 3. Results

The tumorigenicity of the Hep-G2 cell line was initially evaluated by subcutaneous (s.c.) injection into nude mice. We observed the presence of a small number of tumors that subsequently regressed before reaching an acceptable size. Using the same route of injection we further evaluated the tumorigenicity of another liver derived cell line, Huh-7. Similar to HepG2, we found that this cell line was able to produce small tumors that also regressed two weeks post-inoculation (unpublished observation). Since the Huh-7 cell line appeared to be somewhat more robust when administered s.c. in nude mice than Hep-G2, we subcloned the Huh-7 cell line in order to select a clone with a better tumorigenicity *in vivo*. In order to facilitate the clonal selection based on a selective pressure, the T7 RNA polymerase and the neomycin resistance genes were transfected into this cell line. In the initial experiment, thirteen clones resistant to neomycin were obtained each of which were divergent in their multiplication rate as well as in the level of T7 RNA polymerase activity (Fig. 1A). Three clones (# 2, 3, 7 Fig. 1A) were found to have significantly higher levels of T7 RNA polymerase activity, and of these three clones, number 7 was found to have the better growth kinetics and thus it was selected and submitted to a second round of subcloning (Fig. 1B). As mentioned previously, the T7 RNA polymerase activity of different subclones was analyzed. Many of these subclones expressed higher activity than the parental clone # 7 indicating that the subclones were potentially homogeneous. In fact, the level of T7 RNA polymerase activity of some subclones (cytoplasmic extract of  $3 \times 10^4$  cells) was comparable to a level of 5 U of the commercially available T7 RNA polymerase (Ambion, Austin, TX, USA) indicating that the level of active T7 RNA polymerase expressed in these clones is significant (Fig. 1B).

Following selection of HuT7-subclones, we proceeded to the evaluation of the tumorigenicity of a few subclones expressing various levels of T7 RNA polymerase activity (Fig. 2). The results indicated that all of them were poorly tumorigenic in nude mice except for one. This subclone, designated HuT7-3, consistently produced solid subcutaneous tumors that did not regress over time (Fig. 3A). The solid tumors obtained using HuT7-3 were removed, individually cultured *in vitro* and then re-injected into nude mice. Following s.c. injection, the solid mass tumors appeared to grow three times faster than the parent cells suggesting that the cloned cells were adapted for *in vivo* growth in nude mice (data not shown). We then injected the HuT7-3 cells directly into the livers of nude mice to simulate the natural environment of developing HCC. Following injection, orthotopic tumors were reproducibly present and developed well at three weeks post-injection (Fig.

3B). To analyze the cell proliferation status of the normal liver and adjacent tumor area, we evaluated the cyclin, PCNA, expression by Western blot using a specific anti-PCNA monoclonal antibody. In the tumor area, the expression of the PCNA antigen was high compared to the adjacent mouse tissue or normal human liver control tissue, suggesting the proliferative status of the tumor cells (Fig. 3C).

Macroscopic and histopathological examination of different organs from these mice failed to demonstrate distant dissemination of the cells or the development of metastasis except for a small number of mice which harbored small size peritoneal tumors. Compared to normal liver cells, the tumor cells derived from orthotopically implanted HuT7-3 cells were characterized by a basophilic cytoplasm and vacuolated nuclei suggesting the neoplastic character of the cells (Fig. 4A–B). A solid growth pattern and a few mitotic figures were also observed within the HCC with a light fibrous reaction between tumor and normal cells (Fig. 4B). Necrosis was also

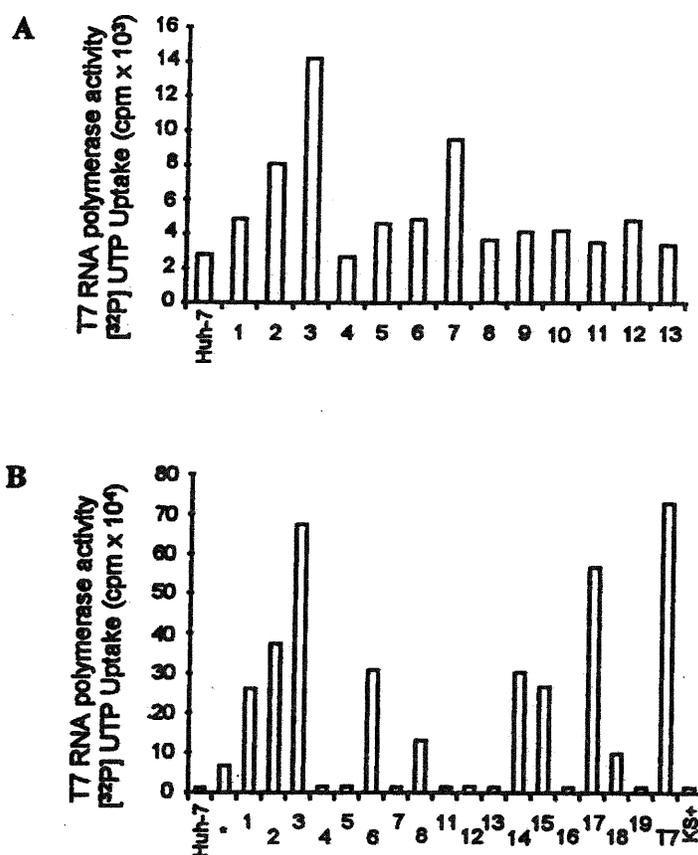


Fig. 1. T7 RNA polymerase activity in HuT7 subclone obtained by transfection of the Huh-7 cells line with pOS2 plasmid. (A) RNA polymerase activity after the first round of subcloning. (B) RNA polymerase activity obtained by cell subcloning of the clone # 7 in A (indicated by an asterisk in B); T7, 5 U of T7 RNA polymerase (Ambion, Austin, TX, USA); KS+, pBluescript-KS+ plasmid.

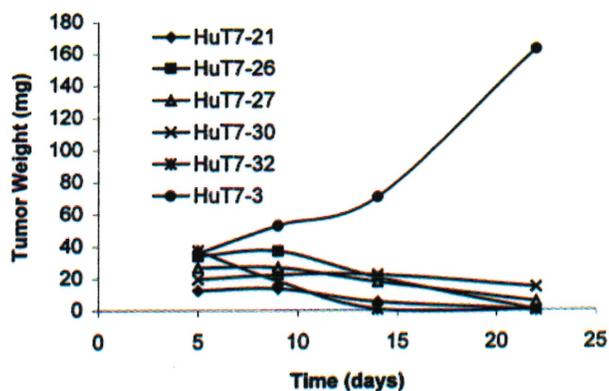


Fig. 2. In vivo tumorigenicity of HuT7-subclones in CD-1 nu/nu mice. For each subclone, five mice were injected subcutaneously with  $5 \times 10^6$  cells at day 0 as described in Section 2. Results represent means from five animals in each group.

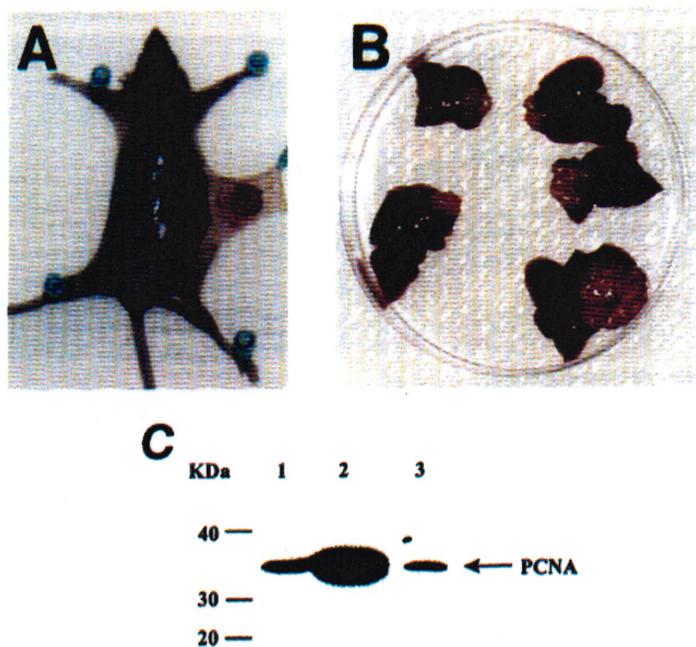


Fig. 3. Solid human HCC tumor in CD-1 nu/nu mice after injection of the HuT7-3 cell (A) subcutaneously or (B) orthotopically. (C) PCNA antigen detection in normal mouse liver (Lane 1); in the adjacent orthotopic tumor (Lane 2); and in normal human liver (Lane 3).

present in the tumor area (Fig. 4C). Spleens, kidneys, and hearts from tumor implanted mice were tumor free preserving normal tissue characteristics except for the lungs which showed an inflammatory response as suggested by a major

polymorphonuclear reaction in the alveoli and around the bronchi (Fig. 4D–E). Ex vivo tumor-derived HuT7-3 cells have conserved, at least in part, some of their initial characteristics since they were morphologically identical to the parent cells and still express albumin (Fig. 5) and T7 RNA polymerase (data not shown).



Fig. 4. Liver and lung sections from normal and human HCC harboring mice. (A) Normal mouse liver. (B) Junction between the mouse liver (top) and the human HCC (bottom). The tumor is surrounded by a fibrous capsule (arrow) and is characterized by a basophilic cytoplasm and a well defined vacuolated nucleus. (C) Necrotic area within the orthotopic tumor (arrow). (D) Normal mouse lungs. (E) Lungs from an orthotopically HCC implanted mouse. A polymorphonuclear reaction in alveoli and around bronchi is observed (A, C and D, Original magnification  $\times 100$ ; B and E, Original magnification  $\times 200$ ).

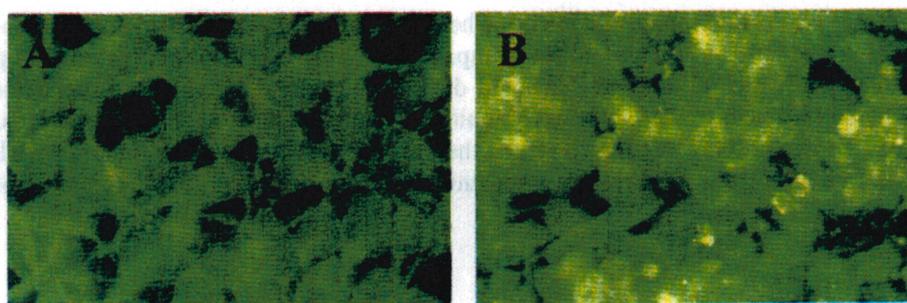


Fig. 5. Analysis of the albumin synthesis by direct immunofluorescence on the human non hepatic 293 cell (A) and the HuT7-3 cells resuspended from the orthotopic HCC (B) using a rabbit IgG anti-human albumin FITC-coupled antibody (original magnification  $\times 630$ ).

Table 1  
In vitro proliferation inhibition of doxorubicin on T7 RNA polymerase expressing Huh-7 subclones

Cells	IC <sub>50</sub> (nM)	T7 RNA polymerase activity <sup>a</sup>
Huh-7	0.97	0
HuT7-21	0.61	21
HuT7-26	0.43	1
HuT7-27	3.12	44
HuT7-30	0.01	81
HuT7-32	0.01	3
HuT7-3	2.29	100

<sup>a</sup> The T7 RNA polymerase activities of the subclones was compared to the activity obtained in the HuT7-3 cells which represent 100%.

The sensitivity to doxorubicin of the parental Huh-7 cells versus the HuT7-subclones was compared using an in vitro cell proliferation inhibition assay. Regardless of the level of T7 RNA polymerase activity, the results indicated that four of the six HuT7-subclones tested had IC<sub>50</sub> values for doxorubicin in the same range as those for the parental Huh-7 cells (Table 1). The IC<sub>50</sub> values of two subclones were 100-fold below the value of the parental Huh-7 cell-line, suggesting that the parental cells are a heterogeneous population with respect to their sensitivity to doxorubicin. The comparison of the subclones reported in Table 1 revealed that the sensitivity to doxorubicin of the HuT7-subclones is independent of the level of T7 RNA polymerase activity. For this reason, we believe that the presence of the T7 RNA polymerase in the HuT7-3 cells should not affect their sensitivity to anti-tumorigenic agents.

To validate this model as a potential tool for the identification of new therapeutic agents against liver cancer, we have injected intravenously a dose of 10 mg/kg doxorubicin (q7dx2) into mice containing either subcutaneously or orthotopically implanted HuT7-3 cells. As shown in Fig. 6, the injection of doxorubicin effectively inhibited growth of subcutaneous tumors. The effect of doxorubicin was even more

pronounced against the development of hepatic tumors in that 58% of the doxorubicin-treated mice were tumor free compared to the control saline-treated group (Table 1) in which all animals harbored detectable tumors. Moreover, tumor sizes in the doxorubicin treated mice were significantly smaller than in the mock-injected mice (Table 2). These results indicate that in the orthotopic liver tumor model, doxorubicin not only inhibits development of tumors but also causes regression of established tumors.

#### 4. Discussion

In general, liver cancers such as HCC are very difficult to treat and represent 4% of all the human cancer [1]. Treatment for liver cancer which includes hepatic resection, percutaneous ethanol injection and liver transplantation are often ineffective when used in patients with more than one small tumor nodule [7]. For these

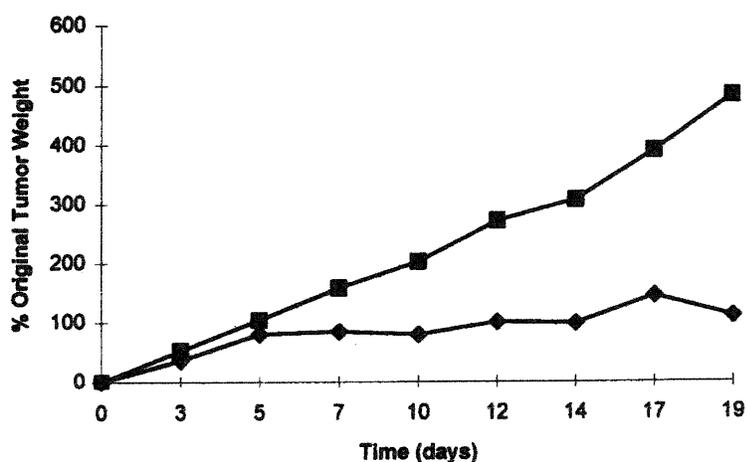


Fig. 6. Inhibition of subcutaneous human HCC growth in CD-1 nu/nu mice using doxorubicin. The inoculation and treatment were carried out as described in Section 2. Intravenous injection of (■), saline; (◆), doxorubicin at 10 mg/kg. Results represent means from four animals in each group.

Table 2  
Effect of doxorubicin on orthotopic human HCC in nude mice

Mice no.	Intravenous injection	Tumor size <sup>a</sup>				Mice with tumor
		–	+	++	+++	
8	Saline	0	2	5	1	8/8
8	Doxorubicin	5	2	1	0	3/8

<sup>a</sup> The tumor sizes were measured 19 days post-treatment with doxorubicin. Tumor size: –, not visible; +, under 14 mm<sup>3</sup>; ++, 15–1000 mm<sup>3</sup>; +++, over 1000 mm<sup>3</sup>.

patients, there is urgent need for the development of new therapeutic agents against HCC. The development of a simple and reproducible animal model is considered an important tool to achieve this goal. For this reason, we have developed an orthotopic xenograft mouse model in which the developing implanted human tissue is imbedded in a hepatic environment. Such a microenvironment is not achievable unless the sample is surgically implanted into the mouse liver. Since the liver is highly vascularized, irrigation of intrahepatic HCC is likely to be superior to those obtained subcutaneously, thus leading to an improved distribution of nutrients and drugs. This may help to explain why some of the orthotopically implanted hepatic tumors, but none of the subcutaneous tumors, disappeared following treatment with doxorubicin (Table 2).

From this study, neither Hep-G2 nor Huh-7 produced non-regressive solid tumors. Previously, it was reported that in order to obtain an accelerated *in vivo* growth and a measurable tumor size from human HCC cells, such as Hep-G2 cells, it is often necessary to irradiate mice and to inject large numbers of cells [23]. As an alternative approach, we have isolated a tumorigenic cell population present in the Huh-7 parental cells by subcloning. One clone obtained from this effort enabled us to establish a definitive human HCC tumor model that expressed the PCNA marker of replicative cells. When the tumorigenicity of the HuT7-subclones was assessed, the only highly tumorigenic clone that was identified was the one expressing the highest level of T7 RNA polymerase (HuT7-3). However, other subclones such as HuT7-27 and HuT7-30 which express a relatively high level of T7 RNA polymerase were found to be poorly tumorigenic. The fact that the more tumorigenic clone, HuT7-3, was the one that showed the highest T7 RNA polymerase activity may be caused by a higher integration ratio of the foreign DNA into this particular clone. Nevertheless, implication of the T7 RNA polymerase in the tumorigenicity of the HuT7-3 cells could not be ruled out. Although the HuT7-3 cells was more tumorigenic than the parental population, it was found to display a conserved cell morphological profile and capacity to produce albumin, both of which are important features for the establishment of a relevant HCC animal model. In addition, the *in vitro* sensitivity of HuT7-3 to doxorubicin was similar to that found for the parental Huh-7 cells. Histological examination of the colonized liver demonstrated the development of an encapsulated nodule of malignant origin which was morphologically verified to be hepatocyte-derived. Examination of the organs has not shown any spread of the original tumor into peripheral tissue with the exception of rare peritoneal nodules. Taken together, these results indicate that the hepatocyte-derived tumors can grow at the site of injection without apparent circulating metastasis.

As anticipated, doxorubicin showed effective antitumor potency against both *s.c.* and orthotopic tumors. The validation of this orthotopic model using doxorubicin demonstrates that this model is sensitive enough to be utilized for the evaluation of antitumoral agents.

### Acknowledgements

We thank Dr Masayoshi Namba, Dr Stanley M. Lemon and Dr Aleem Siddiqui for their kind collaboration and Elysabeth Angers and Lucie Bibeau for their excellent technical assistance. We are also grateful to Dr Robert Rando for critical reading of the manuscript. P.L. was supported in part by a Ph.D. fellowship from the Medical Research Council of Canada.

### References

- [1] Bosch XF. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Tabor E, editors. *Liver Cancer*. New York: Churchill Livingstone, 1998:13–28.
- [2] Koshy R, Meyer M. Oncogenicity of hepatitis B virus. *Rev Med Virol* 1992;2:131–40.
- [3] Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5–14.
- [4] Colombo M. Treatment of hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 1997;4:125–30.
- [5] Delbeke D, Martin WH, Sandler MP, Chapman WC, Wright JK, Pinson CW. Evaluation of benign vs malignant hepatic lesions with positron emission tomography. *Arch Surg* 1998;133:510–5.
- [6] Horigome H, Nomura T, Saso K, Itoh M. Standards for selecting percutaneous ethanol injection therapy or percutaneous microwave coagulation therapy for solitary small hepatocellular carcinoma: consideration of local recurrence. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1914–7.
- [7] Lohmann R, Bechstein WO, Langrehr JM, et al. Analysis of risk factors for recurrence of hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1995;27:1245–6.
- [8] Ojogho ON, So SK, Keeffe EB, et al. Orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma; factors affecting long-term patient survival. *Arch Surg* 1996;131:935–9.
- [9] Figueras J, Jaurrieta E, Valls C, et al. Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: a comparative study. *Hepatology* 1997;25:1485–9.
- [10] Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 1994;54:4726–8.
- [11] Furukawa T, Fu X, Kubota T, Watanabe M, Kitajima M, Hoffman RM. Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. *Cancer Res* 1993;53:1204–8.
- [12] Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5645–9.
- [13] Fu X, Hoffman RM. Human RT-4 bladder carcinoma is highly metastatic in nude mice and comparable to ras-H-transformed RT-4 when orthotopically implanted as histologically intact tissue. *Int J Cancer* 1992;51:989–91.
- [14] Sakakibara T, Chen FA, Kida H, et al. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes is superior to free drug of drug-containing conventional liposomes at suppressing growth and metastases of human lung tumor xenografts. *Cancer Res* 1996;56:3743–6.
- [15] Fu X, Hoffman RM. A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. *Anticancer Res* 1993;13:901–4.
- [16] Fu X, Hoffman RM. Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Res* 1993;13:283–6.
- [17] Fu X, Herrera H, Hoffman RM. Orthotopic growth and metastasis of human prostate carcinoma in nude mice after transplantation of histologically intact tissue. *Int J Cancer* 1992;52:987–90.
- [18] Sun FX, Tang ZY, Liu KD, et al. Metastatic models of human liver cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically patient specimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:397–402.

- [19] Grove KL, Guo X, Liu SH, Gao Z, Chu CK, Cheng YC. Anticancer activity of  $\beta$ -L-dioxolane-cytidine, a novel nucleoside analogue with the unnatural L conformation. *Cancer Res* 1995;55:3008–11.
- [20] Yao Z, Zhou Y, Feng X, Chen C, Guo J. In vivo inhibition of hepatitis B viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in athymic nude mice. *J Viral Hepat* 1996;3:19–22.
- [21] Wang ZF, Stein R, Sharkey RM, Goldenberg DM. Carcinoembryonic antigen and  $\alpha$ -fetoprotein expression and monoclonal antibody targeting in a human hepatoma/nude mouse model. *Cancer Res* 1990;50:8698–728.
- [22] Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980;209:497–9.
- [23] Shouval D, Schuger L, Levij IS, Reid LM, Neeman Z, Shafritz DA. Comparative morphology and tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cell lines in athymic rats and mice. *Virchows Archiv A, Pathol Anat Histopathol* 1988;412:595–606.
- [24] Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982;42:3858–63.
- [25] Sasaki K, Ogino T, Kawasaki S, Okita K, Takemoto T, Takahashi M. Distribution of  $\alpha$ -fetoprotein-producing cells and proliferating cells in human hepatoma cells transplanted into athymic mice. *Tumor Biol* 1987;8:181–5.
- [26] Moore SW, Hesselting PB, Wessels G, Schneider JW. Hepatocellular carcinoma in children. *Pediatr Surg Int* 1997;12:266–70.
- [27] Ryder SD, Rizzi PM, Metivier E, Karani J, Williams R. Chemoembolisation with lipiodol and doxorubicin: applicability in British patients with hepatocellular carcinoma. *Gut* 1996;38:125–8.
- [28] Cay O, Kruskal JB, Nasser I, Thomas P, Clouse ME. Liver metastases from colorectal cancer: drug delivery with liposome-encapsulated doxorubicin. *Radiology* 1997;205:95–101.
- [29] Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8122–6.

## **Article 2**

Submitted to PNAS

*Classification:* Biological Sciences, Medical Sciences.

**Hepatitis C virus Infection of Nude Mice Harboring Human Tumor:  
An Animal Model for the *In vivo* HCV Replication**

Patrick Labonté, Nicolas Morin, Terry Bowlin and Samir Mounir\*

*Authors affiliation:* BioChem Pharma Inc. 275 Armand-Frappier Blvd. Laval, Québec, Canada, H7V 4A7.

\* To whom reprint requests should be addressed at: BioChem Pharma Inc.

275 Armand-Frappier Blvd. Laval, Québec, Canada, H7V 4A7. Tel: [REDACTED]

[REDACTED] E-mail: [REDACTED]

*Manuscript information:* number of text pages, 27; 4 figures and 1 table.

*Word and character counts:* Abstract words, 236; paper characters, 46 533.

*Abbreviations footnote:* HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; UTR, untranslated region; IHC, immunohistochemistry; LDL, low density lipoprotein; HBV, hepatitis B virus.

## ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) replication occurs only in humans and chimpanzees *in vivo*, and so far *in vitro* models of propagation have proven ineffective. In order to provide an alternative to the chimpanzee model, we have established a mouse model based on *ex vivo* infection of orthotopically-implanted human hepatocellular carcinoma (HCC). Tumorigenic Huh-7 derived cells were initially infected with a human HCV-positive serum and then implanted directly into the liver of nude mice. Viral replication was monitored by RT-PCR and immunohistochemistry (IHC). Up to 42 days post-inoculation, HCV RNA was present in the tumoral cells as well as in the liver and serum of infected mice. The serum viral load was quantified using the Amplicor HCV Monitor™ (Roche) and ranged between  $10^2$  to  $10^4$  viral RNA copies per ml. In a cohort of 43 mice, a direct correlation between tumor size and the presence of HCV RNA in the liver was observed. Immunohistochemistry was conducted on liver specimens of infected mice using a polyclonal antibody raised against the viral nonstructural protein NS5B. The results showed the presence of clustered cells expressing the NS5B protein located principally in the portal area. Moreover, we showed that at six weeks post-infection the mice developed humoral response against viral proteins. In summary, the results suggest that mice harboring orthotopic tumors could be a powerful tool to study the mechanism of HCV replication as well as the evaluation of antiviral agents.

## INTRODUCTION

Since the discovery of the causative agent of non-A, non-B hepatitis in 1989 (1), considerable progress has been made on the characterization of hepatitis C virus (HCV) viral genome and proteins. HCV is an enveloped virus belonging to the *Flaviviridae* family (2) and contains a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 9.6 kb which possesses one open reading frame encoding a polyprotein of 3010-3033 amino acids (3, 4). The viral polyprotein is processed into at least 10 functional proteins (C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) by host and viral proteases (5, 6). Upon infection with HCV, 85% of patients develop a persistent infection that could progress to end-stage liver disease such as severe cirrhosis and hepatocellular carcinoma requiring orthotopic liver transplantation (7, 8). The current treatment for chronic hepatitis C infection is interferon therapy, either as monotherapy or in combination with the guanosine analogue ribavirin. However the combination therapy is poorly effective for patient of genotype 1 and the overall sustained virological response represent 40% of the individuals receiving therapy (9).

Despite the increasing knowledge-base, much progress remains to be made on the development of a cell culture system that efficiently supports the replication of HCV. So far, the only *in vitro* reliable replication system available is based on the replication of a subgenomic HCV RNA (replicon) containing the nonstructural proteins of HCV (10) and *in vivo*, the only used

animal model for HCV replication is chimpanzee. Considering the cost of the chimpanzee and the fact that only 39% of them remained chronically infected (11), the development of an alternative *in vivo* model that could facilitate the study of the viral replication cycle and the characterization of antiviral drugs is crucial.

The establishment of a small animal model for HCV replication is difficult due to the apparent lack of permissivity of rodent cells. Nevertheless, HCV replication in rodents has been reported using xenograph of intact HCV-infected human liver specimen implanted into immunodeficient mice (12) or by infection of irradiated shrews with HCV-positive human serum (13). Despite the evidence of HCV replication in these models, the infectivity seems to be low and scarce.

A number of human cell lines, including B- and T-lymphocytes as well as hepatic cells, have been reported to be weakly permissive to HCV infection *in vitro* (14-16). However, no *in vivo* model has been reported using such permissive cell lines. Following a recent report on *in vivo* viral dynamics indicating that *de novo* production of viral particles in humans is as high as  $10^{12}$  viral particles/day (17), we hypothesized that the weak cells permissivity to HCV *in vitro* could be counteracted by the implantation of human infected cells in an *in vivo* hepatic environment. It has been reported that the human HCC-derived cell line, Huh-7, can support viral replication *in vitro* for at least a few weeks (18, 19). Moreover, recent studies have shown that HCV

envelope glycoprotein E2 binds to the Huh-7 cells (20) and Huh-7 cells support efficiently the replication of a HCV subgenomic replicon (10). Together these observations support the suggested permissivity of the Huh-7 cells to HCV. In this report, we used a tumorigenic subclone of this cell line, named HuT7-3, to establish an orthotopic tumor in nude mice (21) that, when infected with HCV, lead to the replication of the virus *in vivo*.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals.

Female CD-1 Nu/Nu mice, 8 to 10 weeks old (Charles River, Canada) were used in this study. All experiments were approved by the Armand-Frappier Animal Care and Use Committee or the BioChem Pharma Animal Care Committee and treated in agreement with the Canadian Council of Animal Care.

### Cells.

The Huh-7 cell line was kindly provided by Dr. Masayoshi Namba (Department of Cell Biology, Institute of Molecular and Cellular Biology, Okayama, Japan). The generation and characterization of a tumorigenic subclone of the Huh-7 cells, referred to as HuT7-3, have been described elsewhere (21). Cells were propagated in Dulbecco's modified Minimum Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin. Prior to injection into nude mice, cells were tested for the presence of mycoplasma (*Mycoplasma pulmonis*) and rodent viruses (MHV, Reo-3, LCMV, MVM, MPV, K virus, polyoma virus, GD-VII, adenovirus, ECT, Sendai, MCMV, MTV, EDIM) using the MAP test (Centre de Biologie Experimentale, Institut Armand-Frappier, Laval, Canada).

### **Orthotopic implantation of infected HuT7-3 cells.**

HuT7-3 cells were trypsinized, washed twice with PBS and gently resuspended in HCV positive human serum (S87) at  $1 \times 10^8$  cells/ml for a resulting multiplicity of infection of 0.01. Cells were then incubated for 2 hours on ice and  $5 \times 10^6$  infected cells were injected directly into the liver of nude mouse. Serum samples were taken weekly while liver and tumor biopsies were collected when the mice were sacrificed at six weeks post-inoculation.

### **RNA Purification and PCR analysis**

Viral RNA purification, PCR mix preparation, cDNA synthesis and nested PCR experiments were all performed in separate rooms in order to avoid contamination from DNA amplicons. The following protocol was used for the purification of total RNA from 50 mg of liver or tumor specimens. Briefly, 750  $\mu$ l of RNAzol B (Tel-Test, Friendswood, TX, USA) were added to the sample, followed by the addition of 80  $\mu$ l of chloroform. Samples were then incubated on ice for 5 min and centrifuged at 13 000g for 15 min. The upper aqueous phase was transferred to a new tube and 1 volume of cold isopropanol was added. After 15 min incubation on ice, the RNA was collected by centrifugation at 13 000 g for 30 min at 4°C. The pellet was washed once with 75% ethanol and centrifuged for another 15 min in a microcentrifuge at

13 000 g. The pellet was dried and the RNA was resuspended in 10 µl of nuclease-free water containing RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA). The HCV viral RNA detection in the liver and tumor specimens was based on the RT-PCR amplification of the 5'-untranslated region (UTR) and the NS3 coding region. A RT-PCR single tube procedure was used with 1 µg of total RNA (Calypso RT-PCR kit, BioCAN, Mississauga, Ontario, Canada) with the following amplification procedure: reverse transcription for 30 min at 50°C, denaturation for 2 min at 94°C and 35 cycles of the following protocol (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 45 sec). For the amplification of the 5'-UTR, the first set of primers was: the reverse primer 5'-UTR-R2: 5'-CTCGCAAGCACCTATCAGG-3' and forward primer 5'-UTR-H3: 5'-GAAAGCGTCTAGCCATGGCGT-3'. The nested PCR were performed with 10% of the RT-PCR product using the Ready-To-Go PCR kit (Amersham/Pharmacia, Baie d'Urfée, Québec, Canada) and the internal primers 5'-UTR-R3: 5'-GTACCACAAGGCCTTTC-3' and 5'-UTR-H6: 5'-GTGCAGCCTCCAGGACC-3'. After 2 min of denaturation at 94°C, the nested PCR was performed for 30 cycles as follow (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 45 sec). For the amplification of the NS3 region, the same procedure was used except that the first set of primers was NS3-R9: 5'-GCTGAAGTCGACTGTCTGGGT-3' and NS3-H11: 5'-CCAAGAAGAAGTGCGACGAGC-3'. The second set of primers was NS3-R10: 5'-TGTGTTACAGTCGATCACCGAGTC-3' and NS3-H16: 5'-TACTACCGGGGTCTCGATGTGTCC-3'. Amplified products were analyzed

by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. For the serum quantification, 200 µl of serum collected at six weeks post-infection was sent to ViroMED (Minneapolis, MN, USA) or to St-Luc Hospital (Montréal, Québec, Canada) on dry ice for quantification by the Amplicor HCV Monitor™ system (Roche, Laval, Québec, Canada).

### **Immunohistochemistry.**

The antibodies used for the IHC study of human liver tissue were directed against the HCV core protein (mouse IgG1 monoclonal antibody #1851, ViroStat, Portland, ME, USA), the full-length *E. coli* expressed NS3 protein (rabbit polyclonal antibody #6245) and the insect cells expressed NS5B protein (rabbit polyclonal antibody #6244). The anti-NS5B polyclonal antibody was shown to recognize specifically the viral protein in infected human liver tissue (data not shown). Prior to the immunostaining procedure, the antiserum was preadsorbed on mouse liver and HuT7-3 cell homogenates to eliminate non-specific cross-reactivity. All tissue sections were fixed in formalin and embedded in paraffin. The IHC was performed at 37°C for 1 hour using the primary antibody (diluted at 1:100). Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and methanol. Avidin and biotin treatment was used to prevent endogenous nonspecific staining. The secondary antibody was a biotinylated horse anti-rabbit or horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The staining was obtained using the

diaminobenzidene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate (DAB, DAKO detection kit; DAKO, Carpinteria, CA, USA) and the sections were counterstained with hematoxylin.

### **ELISA.**

The humoral response against the HCV proteins was evaluated in infected mice by ELISA using the HCV Detect™ Kit (BioChem ImmunoSystems Inc., Montréal, Québec, Canada) as described by the manufacturer with the following modification: 30 µl of mouse serum was used instead of 50 µl of human serum, and the anti-human HRP-conjugated Antibody was replaced by an anti-mouse HRP-conjugated antibody diluted to 1/4000 (Amersham/Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Mice sera that reacted positively in the standard procedure, which included immunoreactive epitope derived from the core, NS3, NS4A/4B and NS5A proteins were further characterized on each individually-coated HCV epitope. The coating of the individual epitopes was performed by the manufacturer in the same manner as for the standard procedure.

## RESULTS

### **Detection of HCV RNA in the liver and tumor specimens as well as in the serum of infected mice.**

Liver and/or tumor specimens were collected at six weeks post-infection and analyzed for the presence of the HCV 5'-UTR RNA by nested RT-PCR. The results indicated that tumor and liver specimens of HCV-infected mice were PCR positive at the end of the experiment, thus suggesting that these mice are infected (Fig. 1A, B). In order to confirm these results, an internal region of the NS3 coding sequences was also amplified by RT-PCR (Fig. 1C). However, the amplification of the NS3 region was less sensitive than the detection of the 5'-UTR. This was probably due to the variability of the NS3 region in the original infectious material, the HCV positive human serum, used for the infection of these mice. For further confirmation, the 5'-UTR and the NS3 PCR products were sequenced.

Since we injected the equivalent of  $5 \times 10^4$  viral genome into each mouse liver, the detection of viral RNA in the serum during the first few weeks post-infection may have reflected residual particles from the original inoculum. In order to ensure that the observed amplification was from *de novo* viral particles, we quantified the HCV RNA viral load at the end of the experiment (six weeks post-infection) using the Amplicor HCV Monitor™ system. In

infected mice harboring tumor, the viral titers ranged from  $10^2$  to  $10^4$  HCV RNA copies/ml. In contrast, viral titers were under the detection limit in the mock-infected mice and in mice intrahepatically injected with the HCV positive serum in absence of human cells, indicating that in absence of tumors, the mice had cleared the virus present in the original inoculum (Fig. 2A). Interestingly, these results indicate that the presence of the tumor is required for viral replication and consequently for the detection of the virus in the blood circulation.

#### **Mice harboring large tumor are HCV positive in the liver.**

In a cohort of 43 infected mice, we showed that the presence of the HCV RNA genome in the mouse liver correlates well with the size of the solid tumor present in the liver of infected animal (Table 1). Indeed, all mice harboring tumors larger than 0.5 g were PCR-positive for the HCV 5'-UTR (12/12, 100%). Conversely, mice with tumors smaller than 0.5 g, were PCR-positive at a lower frequency (5/13, 38.5%) and tumor-free mice have no detectable HCV genome in their liver (0/9, 0%). These results strongly suggest that the tumor is the initial reservoir of virus in the mice, followed by the migration of the virus outside of the tumor and eventually spreading into the mouse liver. However, the HCV genome was not detected in all tumors, indicating that the level of HCV replication in tumoral cells is low. In fact, most of the HCV-positive tumors are of medium size (0.3-0.5 g), suggesting that necrotic areas observed in larger tumors could reduce the proportion of

HCV genome or that the rate of cell division is higher than the viral replication in those tumors. Since the tumor size is a good indicator of infection, we expected that the HCV serum titer would increase with the tumor size. However, tumor size was not an absolute predictor of a high viral load in the circulating blood (Fig. 2B).

### **Expression of the HCV non-structural NS5B protein in the infected mouse hepatocytes.**

In order to detect HCV proteins directly in the infected mice tissue, we investigated the reactivity and specificity of antibodies directed against the HCV core, NS3 and NS5B proteins by IHC on human HCV-positive and negative liver specimens. Out of these three antibodies, a rabbit polyclonal antiserum directed against the HCV non-structural NS5B protein reacted specifically on HCV-positive human tissues but not on HCV-negative tissues. This unique property makes the anti-NS5B antibody the ideal reagent for the detection of the viral protein in the infected mouse specimens. The results showed that hepatocytes from infected mice harboring HCC expressed the NS5B protein up to six weeks post-infection (Fig. 3D-F). Moreover, cells expressing the NS5B protein were principally located around the portal vein suggesting that the viral infiltration occurs probably via blood circulation. Hepatocytes of infected mice that are tumor-free were found to be negative for the HCV NS5B protein (Fig. 3B, C). As control, the pre-immune serum or anti-NS5B serum pre-adsorbed on *in vitro* expressed NS5B protein were used

and no specific staining was observed (Fig. 3G, H). The fact that only hepatocytes from HCC-harboring mice expressed the HCV NS5B viral protein suggests that the proximity of the viral reservoir (i.e., the human cells) is required for propagation of the virus in murine tissue. The level of NS5B expression in the infected human HCC seems to be much lower than in the mouse hepatocytes since only a few infected HCC derived cells stained positively (data not shown). This is in agreement with the low level of HCV protein expression observed by IHC in tumoral area of infected human liver tissue (22).

#### **Serological response to HCV-proteins in the serum of infected mice.**

In some cases, athymic mice which have only subsidiary T cell population, are nevertheless able to build an efficient immune response against viruses (23-25). Since the HCV genome and the NS5B protein were detected six weeks post-infection, we attempted to determine whether the infected mice were able to build a humoral response against HCV during this period. The antibody response to HCV in different sera collected at three, five and six weeks post-infection was monitored using the Detect-HCV™ kit (Biochem Immunosystem Inc., Montréal, Québec, Canada) which can detect antibodies against Core, NS3, NS4A/B and NS5A proteins (Fig. 4A). Prior to week six, the results indicated that no serological response could be detected against HCV (data not shown). However, at six weeks post-infection, a

seroconversion occurred in three out of the 43 infected mice (Fig. 4A). The cut-off value was determined by the average of the sera from three mock-infected nude mice and was subtracted from all data. Clearly, a strong serological response was observed in sera from mice number 5, 21 and 22 (Fig. 4B). In order to determine which epitopes were responsible of the serological response in these three mice sera, we performed an ELISA test on the individually-plated epitopes. The results suggest that the humoral response was directed mainly against the NS4A/B junction region, and to a lesser extent against the NS3 region. (Fig. 4C). Since these two proteins are nonstructural, their incorporation into the mature viral particle is unlikely and thus provides an indication that the humoral response observed was induced by the HCV proteins produced in the cells rather than by proteins present in the initial viral inoculum.

## DISCUSSION

Despite the tremendous efforts within the last decade to develop an efficient *in vitro* HCV replication system, much progress remains to be made. Moreover, the discovery of antiviral agents against HCV is limited by the absence of both a cell culture and a convenient animal model for HCV replication. The hypothesis that the *in vivo* environment could be necessary to stimulate the viral replication is reinforced by the observation that infectious HCV cDNA clones could produce high levels of viral particles in the chimpanzee but not in cell culture (26, 27). In addition, viral replication in human is efficient (17) when compared to the replication observed in primary hepatocyte cultures (28). According to these observations, we hypothesized that implantation of human infected cells in the mouse liver may lead to efficient HCV replication by mimicking the natural hepatic micro-environment potentially necessary for viral replication. Previously, we described the development of a human orthotopic HCC model in nude mice using the HuT7-3 cells (21). We now show that following the *in vitro* infection of those cells with HCV-positive serum, the developing HCC can support the viral replication that could in turn produce foci of infection in the mouse liver. Indeed, the detection by RT-PCR of two different regions of the HCV genomic RNA (the 5'-UTR and the NS3 regions) and the presence of the NS5B protein into the mouse hepatocytes, at six weeks post-infection, suggest strongly that HCV replication takes place in the infected mouse cells. It is possible that the HCV positive cells present in the liver area could result from the migration of

tumorigenous human cells. However, this possibility was deemed unlikely since positively stained cells were found to be morphologically identical to the adjacent mouse hepatocytes, as confirmed by an independent hepatologist (Dr Marc Bilodeau, St-Luc Hospital, personal observation). Nevertheless, the importance of the human tumor for the infection was demonstrated by: (i) the direct correlation between tumor size and the presence of the HCV genome in the mouse liver (Table 1), (ii) the absence of virus in the circulating blood of tumor-free mice six weeks post-infection (Fig. 2B) and (iii) the absence of staining by IHC in the liver of tumor-free mice (Fig. 3B and C). However, the HCV titer in the serum of infected mice harboring tumor is relatively low, ranging from  $10^2$  to  $10^4$  RNA copies/ml as monitored by Amplicor HCV Monitor™, and the question of whether the tumor size influences the blood viral load is still raised (Fig. 2B).

Noteworthy, since the mice were HCV positive for up to six weeks post-infection, it is possible that an anti-HCV humoral response has been build. Indeed, a strong serological response was observed six weeks post-infection using the ELISA test which provides evidence for a sustained HCV replication in these mice (Fig. 4). The development of a humoral response in an athymic mouse is usually T-independent (23, 29), thus implying the cross-linking of two B-cell receptors. In the three mouse sera that were found to be serologically positive to HCV epitopes, the most reactive region was the NS4A/B junction. Whether or not the NS4A/4B epitope can cross-link the B-cell receptors requires further investigation.

The data accumulated in this study suggest that the mouse cells could be infected *in vivo* following the continuous expression of HCV particles by the human tumor cells. A recent report indicates that the human CD81 molecule could be involved in the attachment of HCV particles to the cells but the data indicating the involvement of CD81 in the viral entry are still missing (30). Pireli et al., 1998, have also shown that mouse CD81 does not bind to viral particles, which means that in our replication model the attachment of the virus cannot be mediated by CD81. However, since HCV can form complex with the low density lipoprotein (LDL) or very low density lipoprotein (VLDL) in the blood circulation, it has been suggested that HCV entry may occur via the LDL receptors (LDL-R) (19, 31, 32). Recently, the cell entry of lipoprotein-coated virus through the LDL-R has been confirmed for the Flaviviridae viruses, HCV, GB virus/Hepatitis G virus and bovine viral diarrhea virus (33). Interestingly, Mouse and human, for at least some members of the LDL-R family, share great interspecies conservation, which can reach as high as 98% of identity at the amino acid level (34, 35). Given that, HCV particles probably form a complex with the LDL or VLDL particles in the circulating blood of infected mice, it appears justified to assume that HCV may enter into the mouse hepatocytes via members of the LDL-R family. This mechanism could also be explained by the presence of HCV RNA in human non-hepatic cells, particularly peripheral blood mononuclear cells (36-38). The infection of mouse hepatocytes with HCV, as observed by the IHC study, is weak. Once into the cells the virus appears to express a high amount of proteins, as

indicated by the staining of the hepatocytes, compared to the tumor induced by human HuT7-3 cells. Three major reasons could explain why the *in vivo* infection of mouse cells was not reported previously: (i) the mice did not become infected in the absence of human cells, (ii) the low level of HCV replication in the mice has made the detection of the HCV genome difficult, and (iii) the absence of suitable antibodies available for immunohistochemistry analysis makes the detection of viral antigen in the hepatocytes difficult.

A similar mouse model has been reported for hepatitis B virus (HBV) and used for the evaluation of antiviral agents (25, 39, 40). Indeed, HBV genome-transfected HepG2 cells (2.2.15 cells) inoculated into nude mice produced HBV-positive tumors. Moreover, these HBV-infected nude mice developed humoral response against HBV core antigen (40). For HCV, in the absence of a transgenic mouse model expressing the viral receptors necessary for the viral entry, the model presented here could be used as an alternative *in vivo* small animal model which will be helpful for the understanding of HCV replication cycle and for the study of the pathobiology of HCV as well as for the investigation of antiviral agents that inhibit viral replication in an *in vivo* context.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Masayoshi Namba for providing the Huh-7 cells and Sophie Fleurent for her excellent technical assistance. We are also grateful to Drs. Bernard Willems and Marc Bilodeau (Department of Hepatology, St-Luc Hospital, Montréal, Québec, Canada) for their advice and helpful discussions. We are also indebted to Monique Guitard and Dr. Yvan Côté for their collaboration (Biochem ImmunoSystems Inc., Montréal, Canada). P.L. was supported in part through the Medical Research Council of Canada fellowship (no.10432). This work is part of P.L. Ph.D. dissertation.

## REFERENCES

- 1 Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989) *Science* **244**, 359-362.
- 2 Rice, C. M. (1996) in *Fields Virology*, eds. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), 3rd. Ed., pp. 931-959.
- 3 Kato, M., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. & Shimotohno, K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9524-9528.
- 4 Takimizawa, A., Mori, C., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I. & Okayama, H. (1991) *J. Virol.* **65**, 1105-1113.
- 5 Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993) *J. Virol.* **67**, 1385-1395.
- 6 Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994) *J. Virol.* **68**, 5063-5073.
- 7 Iwarson, S. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 201-204.

- 8 Di Bisceglie, A. M. (1997) *Hepatology* **26** (Suppl. 1), 34S-38S.
- 9 Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C. & Albrecht, J. (1998) *Lancet* **352**, 1426-1432.
- 10 Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999) *Science* **285**, 110-113.
- 11 Bassett, S. E., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (1998) *J. Virol.* **72**, 2589-2599.
- 12 Galun, E., Burakova, T., Ketzinel, M., Lubin, I., Shezen, E., Kahana, Y., Eid, A., Ilan, Y., Rivkind, A., Pizov, G., Shouval, D. & Reisner, Y. (1995) *J. Inf. Dis.* **172**, 25-30.
- 13 Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P. & Prieto, J. (1998) *Virology* **244**, 513-520.
- 14 Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5477-5481.

- 15 Tsoboi, S., Nagamori, S., Miyazaki, M., Mihara, K., Fukaya, K., Teruya, K., Kosaka, T., Tsuji, T. & Namba, M. (1996) *J. Med. Virol.* **48**, 133-140.
- 16 Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D. C., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1998) *J. Gen. Virol.* **79**, 1383-1386.
- 17 Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. (1998) *Science* **282**, 103-107.
- 18 Yoo, B. J., Selby, M. J., Choe, J., Suh, B. S., Choi, S. H., Joh, J. S., Nuovo, G. J., Lee, H. S., Houghton, M. & Han, J. H. (1995) *J. Virol.* **69**, 32-38.
- 19 Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L. & Goeser, T. (1997) *J. Gen. Virol.* **78**, 2467-2476.
- 20 Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. & McKeating, J. A. (1999) *J. Virol.* **73**, 6235-6244.
- 21 Labonté, P., Kadhim, S., Bowlin, T. & Mounir, S. (1999). *Hepatol. Res.* In Press.

- 22 Sansonno, D., Cornacchiulo, V., Racanelli, V. & Dammacco, F. (1997) *Cancer* **80**, 22-33.
- 23 Freer, G., Burkhart, C., Ciernik I., Bachmann, M. F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1994) *J. Virol.* **68**, 3650-3655.
- 24 Franco, M. A. & Greenberg, H. B. (1997) *Virology* **238**, 169-179.
- 25 Zhai, W. R., Vajta, G., Acs, G., & Paronetto, F. (1990). *Gastroenterology* **98**, 470-477.
- 26 Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997) *Science* **277**, 570-574.
- 27 Yanagi, M., St-Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (1998) *Virology* **244**, 161-172.
- 28 Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J. & Maurel, P. (1998) *J. Gen. Virol.* **79**, 2367-2374.
- 29 Speiser, D. E., Stubi, U. & Zinkernagel, R. M. (1992) *Nature* **355**, 170-172.

- 30 Pireli, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998) *Science* **282**, 938-941.
- 31 Prince, A. M., Huima-Byron, T., Parker, T. S. & Levine, D. M. (1996) *J. Viral. Hepat.* **3**, 11-17.
- 32 Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G. & Uy, A. (1992) *Med. Microbiol. Immunol.* **181**, 293-300.
- 33 Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q.-X. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12766-12771.
- 34 Murao, K., Terstra, V., Green, S. R., Kondratenko, N., Steinberg, D. & Quehenberger, O. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17551-17557.
- 35 Brown, S. D., Twells, R. C., Hey, P. J., Cox, R. D., Levy, E. R., Soderman, A. R., Metzker, M. L., Caskey, C. T., Todd, J. A. & Hess, J. F. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 879-888.
- 36 Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L.-F., Jang, S. J., Vargas, H. & Rakela, J. (1998) *Virology* **248**, 164-171.

- 37 Bronowicki, J.-P., Lorient, M.-A., Thiers, V., Grignon, Y., Zignego, A. L. & Bréchet, C. (1998) *Hepatology* **28**, 211-218.
- 38 Roque Alfonso, A. M., Jiang, J., Penin, F., Tareau, C., Samuel, D., Petit, M.-A., Bismuth, H., Dussaix, E. & Féray, C. (1999) *J. Virol.* **73**, 9213-9221.
- 39 Almog, Y., Klein, A., Adler, R., Laub, R., & Tur-Kaspa, R. (1992) *Antiviral. Res.* **19**, 285-293.
- 40 Yao, Z., Zhou, Y., Feng, X., Chen, C., & Guo, J. (1996). *J. Viral. Hepat.* **3**, 19-22.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Amplification of HCV 5'-UTR (A-B) or NS3 region (C) by nested-PCR on 10 infected mice six weeks post-infection. (A), RNA prepared from orthotopic tumors. (B), RNA prepared from liver specimens. (C), PCR amplification of the NS3 region from liver RNA. N, negative control (PCR amplification performed in the absence of RNA). P, positive control (PCR amplification performed using 20 copies of HCV RNA). M, 100 bp DNA mass Ladder.

**Fig. 2.** Quantification by Amplicor HCV Monitor™ of HCV RNA in infected mouse sera six weeks post-infection. (A), mouse sera are ranked based on the viral load (from low to high). (i), mice injected with HCV positive human serum, (ii), mice injected with infected HuT7-3 cells. (B), Similar to A but the mouse sera are ranked based on the tumor size (from small to large). MI, mock-infected mice.

**Fig. 3.** Detection of HCV NS5B protein by immunohistochemistry on liver sections. A, Mock-infected mouse; B-C, Infected mice in the absence of tumor; D-F, Infected mice harboring medium or large tumor. Positively stained cells are indicated by arrows; G, Similar to E but using pre-immune serum; H, Similar to E but using the NS5B pre-adsorbed anti-NS5B antibodies. Original magnification, X400.

**Fig. 4.** Humoral response developed 6 weeks post-infection in infected nude mice. The HCV gene organization at the top. Black bars indicate the HCV epitopes included in the ELISA test. (A), Identification of reactive sera by ELISA from the 43 infected mice. N, negative control (anti-NS5B polyclonal antibody). P, positive control (anti-NS3 polyclonal antibody). (B), Characterization of the reactive sera in A on the individually coated epitopes shown at the top. Values in A and B are the reactivity over the background of mock-infected mouse sera.

FIGURE 1

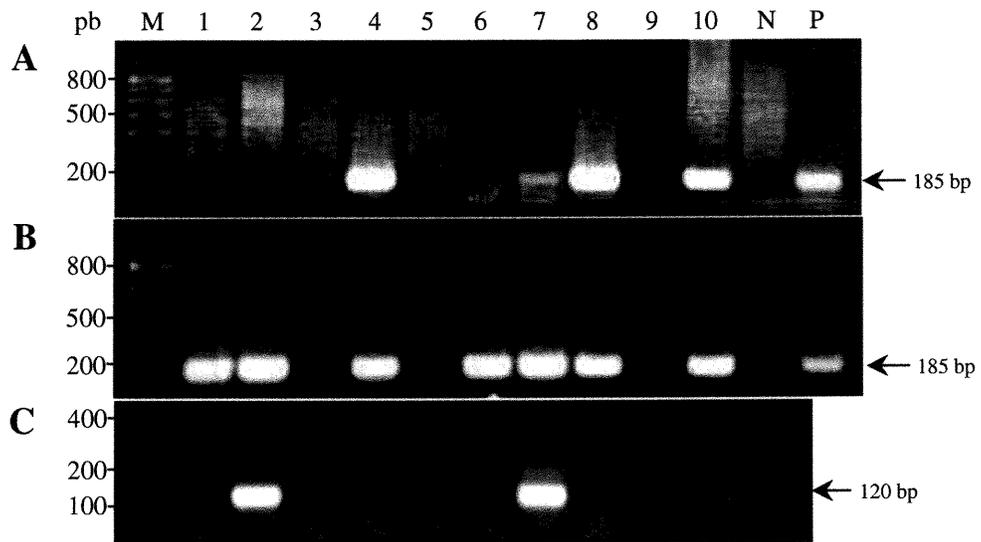


Table 1. HCV RNA detection in infected mice<sup>a</sup>: Correlation with the tumor size.

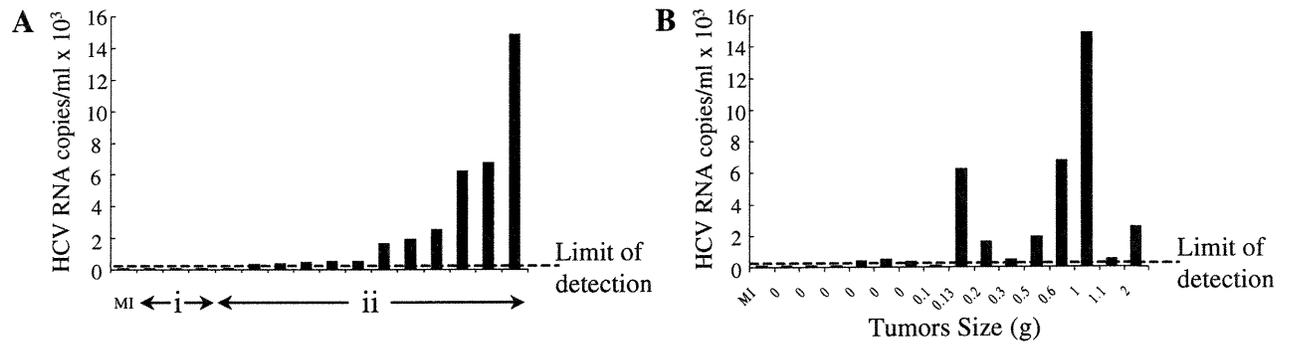
Tumor Weight (g)	Number of Mice	Number of mice HCV positive	
		Tumor	Liver
NT	9	—	0 (0%)
< 0.1	9	2 (23%)	ND
0.1-0.3	4	1 (25%)	1 (25%)
0.3-0.5	9	6 (66%)	4 (45%)
> 0.5	12	2 (18%)	12 (100%)

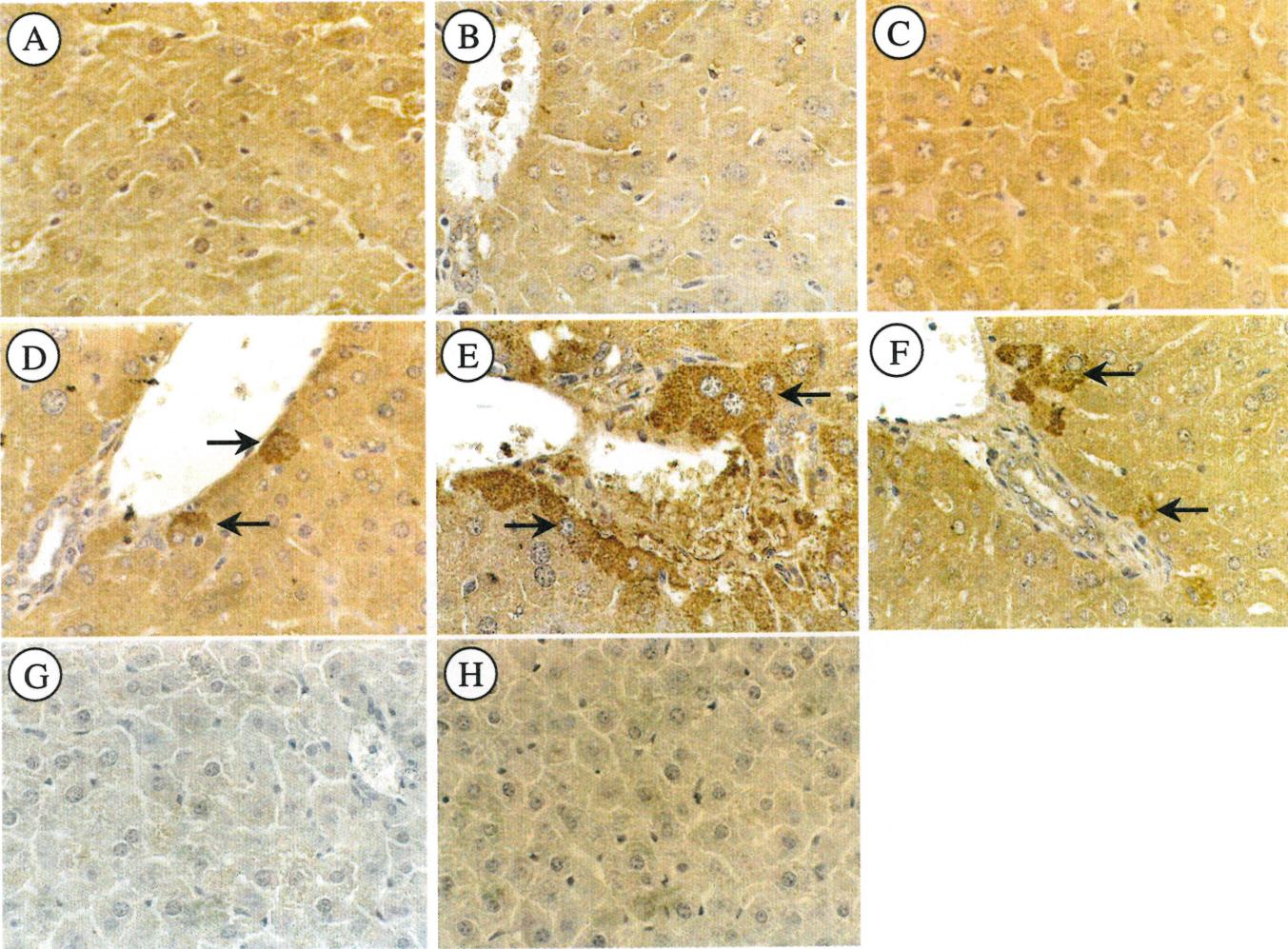
<sup>a</sup> All 43 mice have been injected with infected HuT7-3 cells at day 0 and specimens were taken at day 42 post-infection.

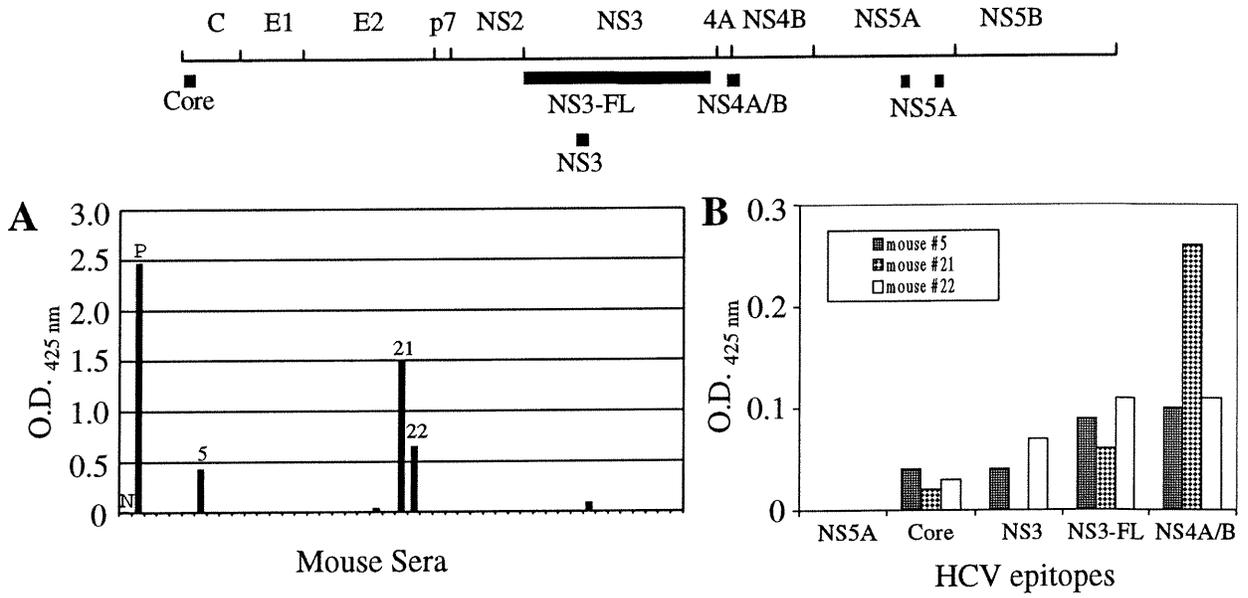
<sup>b</sup> RT-PCR have been performed with 1  $\mu$ g of RNA and 10% of the RT-PCR product was used for the second round of PCR.

NT, No tumor. ND, not done.

FIGURE 2







## **Discussion**

Depuis plus de 10 ans des efforts très importants ont été mis sur le développement d'un modèle de réplication pour le VHC. Actuellement, le seul système fonctionnel permettant l'étude de la réplication du VHC est le chimpanzé, mais celui-ci est très dispendieux et peu accessible. Malgré l'importance reliée au développement d'un modèle de réplication animale, très peu de travaux ont été rapportés sur le sujet. Lorsque nous avons entrepris notre étude en 1996, un seul rapport avait été publié sur ce sujet (Galun et al., 1995). Pour initier l'infection chez l'animal, les auteurs ont utilisé des morceaux d'un foie humain infectés par le VHC qu'ils implantent sous la capsule surrénale de souris immunodéficientes. Par ce procédé, jusqu'à 50% des souris possèdent  $10^2$ - $10^3$  génomes viraux/ml sérum. Tous les résultats qualitatifs et quantitatifs rapportés dans cette étude proviennent de résultats de RT-PCR et bien que très prometteuse, l'utilisation de ce modèle à grande échelle comporte quelques difficultés techniques et conceptuelles. Ainsi, chaque expérimentation nécessite des spécimens provenant d'un foie humain infecté par le VHC. Puisque ces spécimens histologiques ne peuvent pas être maintenus fonctionnels *ex vivo* pendant une longue période de temps, chaque expérimentation nécessite de nouveaux spécimens provenant de nouveaux individus. Étant donné les variations dans le titre viral entre chaque individu infecté, la reproductibilité des résultats est incertaine. Également, le spécimen histologique implanté est un morceau de foie normal non tumoral qui ne peut donc pas croître chez l'animal. Au mieux, l'implant peut se maintenir dans un état stationnaire pendant quelques jours avant que sa dégénérescence ne commence. Si l'on

suppose que le virus se réplique principalement dans le tissu humain, alors le titre viral ne peut que diminuer de jour en jour. Afin de contourner certains des facteurs énumérés ci-dessus, nous avons imaginé un modèle différent de celui rapporté par Galun et al. L'idée derrière notre modèle était d'implanter des cellules tumorigéniques d'origine hépatique humaine susceptible au VHC directement dans le foie de souris immunosupprimées. L'utilisation de tumeur hépatique orthotopique comporte quelques avantages comparativement à l'implantation de morceaux de foie normaux. En effet, en utilisant des cellules tumorigéniques qui peut induire une tumeur, on s'assure de la disponibilité et de l'uniformité du matériel de départ, ce qui favorise la reproductibilité des résultats. De plus, contrairement à des cellules normales, les cellules tumorigéniques se multiplient chez l'animal avec le temps, ce qui augmente le nombre de cellules servant de support à la réplication du VHC. Finalement, puisque la tumeur se développe dans un milieu hépatique, il est possible que certains facteurs présents dans ce microenvironnement permettent l'augmentation de la réplication virale.

Notre hypothèse de départ était que le VHC pourrait se répliquer *in vivo* s'il était introduit *in vitro* dans une lignée cellulaire susceptible au virus puis implanté *in vivo* dans un environnement favorable à la réplication du virus. Afin de tester cette hypothèse, il fallait d'abord développer une lignée hépatique humaine susceptible *in vitro* à la réplication du VHC et réussir à induire la formation d'une tumeur solide dans le foie de l'animal à partir de ces cellules. En 1996, aucune lignée cellulaire ne remplissait ces deux

conditions. Afin d'établir notre modèle animal, nous avons opté pour la lignée cellulaire Huh-7 parce qu'elle provient d'un carcinome hépatocellulaire humain et qu'elle est également permissive à la réplication du VHC. En effet, bien que la réplication du VHC dans les cellules Huh-7 soit faible, celle-ci persiste pour plusieurs jours à plusieurs semaines *in vitro* (Yoo et al., 1995; Seipp et al., 1997). De plus, les cellules Huh-7 sont actuellement les cellules les plus utilisées pour étudier les diverses étapes de la réplication du virus tel que l'interaction du virus avec les cellules, l'expression des protéines virales et la réplication d'ARN viraux sous génomiques (réplicon) (Flint et al., 1999b; Lohmann et al., 1999; Fipaldini et al., 1999).

Lorsque nous avons obtenu la lignée cellulaire Huh-7 du Dr. Masayoshi Namba (Okayama, Japon), nous avons tout d'abord évalué et comparé le potentiel tumorigénique *in vivo* des cellules Huh-7 et Hep-G2 (obtenu de l'ATCC). Malheureusement, comme pour la majorité des lignées hépatiques humaines, le potentiel tumorigénique de ces deux lignées cellulaires était faible car deux semaines après l'injection, les tumeurs sous cutanées régressaient. Dans ce contexte, les cellules Huh-7 ne pouvaient pas servir telles quelles pour établir notre modèle. C'est pourquoi nous avons entrepris de sous-cloner cette lignée cellulaire afin d'isoler une sous population cellulaire plus tumorigénique que la population parentale. Afin de faciliter l'isolement et le suivi des sous-clones de la lignée Huh-7, nous avons transfecté le gène procurant la résistance à la néomycine dans la lignée Huh-7. De plus, le gène exprimant la polymérase d'ARN du bactériophage T7 a

également été transfecté pour permettre un meilleur suivi des sous-clones et éventuellement afin d'initier l'infection dans les sous-clones, à partir d'un clone complet d'ADN complémentaire du VHC sous le contrôle transcriptionnel du promoteur T7. Suite aux sous-clonage, nous avons isolé un clone que nous avons désigné HuT7-3, capable de produire des tumeurs sous cutanées chez la souris. Dans le but d'augmenter davantage le potentiel tumorigénique de ce clone, la tumeur fut cultivée *ex vivo* en présence de généticine pour éliminer les fibroblastes puis les cellules furent réimplantées *in vivo*. Par ce procédé, les tumeurs se sont développées de deux à trois fois plus rapidement dans la souris. Habituellement, la tumorigénicité d'une cellule est supérieur lorsque celle-ci est implantée sous la peau. Puisque notre objectif était de produire des tumeurs orthotopiques, nous espérons que les cellules HuT7-3 pourraient former des tumeurs solides dans le foie des souris. Pour ce faire, nous avons injecté les cellules HuT7-3 directement dans le foie des souris et analysé la présence de tumeurs orthotopiques trois semaines post-injections. Les résultats montrent que plus de 80% des souris ont développé une tumeur orthotopique solide.

Chaque année, plus de 300 000 nouveaux cas de cancer du foie sont diagnostiqués. Ce type de cancer est extrêmement difficile à traiter et est fatal dans la plupart des cas. Compte tenu de l'incidence mondiale élevée du VHC et du VHB, deux virus associés au développement du cancer du foie, le nombre de nouveau cas de cancer du foie va possiblement augmenter durant les prochaines années. Dans ce contexte, le développement de modèles

orthotopiques du cancer du foie humain est important pour l'évaluation d'agents antitumoraux. À notre connaissance, le modèle orthotopique développé ici est le seul où les cellules ne sont pas infectées par le VHB ce qui diminue les risques d'infection inhérents à l'utilisation de cellules d'origines humaines. Afin de valider et de démontrer l'utilité de notre modèle, nous avons évalué l'effet de la doxorubicine, un agent thérapeutique antitumoral bien connu, sur la progression et le développement des tumeurs sous-cutanées et orthotopiques. Tel que prévu, la doxorubicine inhibe la croissance des tumeurs et permet même la régression des tumeurs orthotopiques établies. L'avantage de ce modèle orthotopique est qu'il mime d'avantage l'environnement naturel dans lequel se développe la tumeur chez l'individu et permet donc d'évaluer l'effet des agents antitumoraux dans un contexte se rapprochant de celui observé chez l'homme.

Puisque les cellules HuT7-3 dérivent des cellules Huh-7, leur permissivité au VHC était anticipée. Néanmoins afin de confirmer la permissivité des cellules HuT7-3 *in vitro*, nous avons infecté ces cellules avec du sérum provenant d'un patient positif pour le VHC. Nous avons analysé la réplication du virus dans ces cellules aux jours 2, 9 et 14 et les résultats montrent clairement la présence du génome viral dans le surnageant cellulaire au jour 2 et 9 post-infection. Comme prévu, le titre viral est faible ( $\sim 10^2$  génome viraux/ml) mais comparable au niveau rapporté pour la lignée parentale Huh-7. Puisque notre hypothèse suggère que la faible réplication du VHC observée dans toutes les lignées cellulaires est causée par l'absence de facteurs présents

uniquement *in vivo*, nous n'avons pas poussé d'avantage l'analyse de la réplication *in vitro* du VHC dans les cellules HuT7-3.

La procédure utilisée afin d'induire l'infection des cellules HuT7-3 chez la souris est probablement déterminante pour la réussite de l'expérience. Afin de favoriser l'adsorption du virus sur la cellule, nous avons incubé les cellules HuT7-3 en présence d'un sérum de patient positif pour le VHC pendant deux heures à 4°C. Puisque l'infection est possiblement inefficace *in vitro*, la solution complète cellules-virus a été injectée directement dans le foie de la souris nude sans aucun lavage ou précipitation des cellules afin d'être certain que toutes les particules virales sont injectées dans l'animal. De cette façon, si l'entrée du virus dans la cellule nécessite des facteurs *in vivo* tels que la présence de LDL ou VLDL (voir la section 2.8), ceux-ci pourront interagir avec le virus à l'intérieur de l'animal.

La détection du génome viral du VHC est un travail particulièrement difficile compte tenu de la faible charge virale et de la très grande hétérogénéité de séquence du virus. La limite de détection d'un ADN par PCR peut être dans les meilleures conditions aussi bas que 1 copie, par contre la limite de détection d'un ARN par RT-PCR est de l'ordre de 1000 copies par réaction. Comme exemple, si vous avez un échantillon de sérum avec un titre viral de 1000 copies d'ARN viral par ml, vous devrez utiliser l'ARN provenant de tout le ml pour avoir 1000 copies et ainsi avoir une chance de détecter le virus. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, l'ARN génomique du VHC est

amplifié en utilisant la technique de «Nested» PCR. Dans cette technique, le matériel obtenu après une première réaction d'amplification de RT-PCR est soumis à une deuxième réaction de polymérisation en chaîne PCR avec des amorces internes afin d'augmenter la sensibilité de la détection. Cette méthode a permis l'amplification chez l'humain des régions moins conservées du génome du VHC. Ces régions sont impossibles à amplifier par simple RT-PCR même en utilisant du sérum avec une charge virale de  $10^6$  copies d'ARN virale/ml. Lorsque vous travaillez à partir d'échantillons sériques d'humains ou de chimpanzés, vous pouvez augmenter la quantité d'ARN viral dans vos réactions en augmentant la quantité de sérum utilisé, chez la souris cela est impossible. En effet, la quantité maximale de sang prélevé sur une base hebdomadaire ne doit en aucun cas dépasser 10% du volume sanguin de l'animal (2 ml) ce qui correspond à 200 ul de sang (~80 ul de sérum). Par contre, lorsque l'animal est sacrifié, 1 ml de sang (~450 ul de sérum) est prélevé ce qui est suffisant pour répéter une deuxième fois les amplifications. L'amplification du génome viral à partir d'échantillons d'organes soulève un second problème que certains chercheurs ont rencontré lorsqu'ils ont caractérisé la réplication du VHC dans des sites extrahépatiques. En effet, si la charge virale du virus est faible dans un organe donné, la détection du génome viral devient problématique puisque au-delà du 6 ug d'ARN par réaction, l'amplification du VHC est inhibée (Laskus et al., 1998).

Afin de démontrer la présence du génome viral chez les souris infectées, nous avons procédé à des «Nested» PCR en utilisant des amorces situées

dans la région 5'-RNC du génome viral. Cette région est très conservée entre les différents génotypes et sous-type du virus et les amorces que nous avons choisies sont utilisées de façon standard pour le génotypage des patients car ils peuvent s'hybrider à tous les isolats du virus. Une fois les études d'amplification de la région 5'-RNC terminées, nous avons confirmé la présence du génome viral par l'amplification de la région NS3. Les résultats indiquent que plusieurs échantillons positifs pour la région 5'-RNC se sont avérés négatifs pour la région NS3. Il est clair que la détection de cette région est beaucoup plus difficile que la région 5'-RNC en raison de la grande variabilité génomique observée à l'intérieur de cette région.

Lors de la planification des expérimentations, l'un des objectifs était de définir l'apport et l'utilité de la tumeur humaine pour la réplication du virus chez la souris. C'est pourquoi, nous avons catégorisé les souris infectées en fonction de la présence et de la grosseur des tumeurs intrahépatiques. Les résultats d'amplifications obtenus à partir des échantillons de foies et de tumeurs, indiquent que plus de la moitié des animaux infectés expriment le génome viral 42 jours post-infection. Compte tenu de la faible quantité de virus inoculée au départ (45 000 génomes équivalents d'ARN viraux) et la demi-vie du virus qui chez l'humain est entre 2.3-2.7 heures, il est peu probable que l'ARN détecté 42 jours après l'inoculation provienne de l'inoculum de départ. Il est vrai que le temps de demi-vie du VHC dans un environnement partiellement immunosupprimé comme la souris nude peut être plus long que chez un humain immunocompétent. Néanmoins, l'activité antivirale produite

par les cellules NK «Natural Killer» est intacte dans les souris nude et comme nous l'avons montré, une réponse humorale dirigée contre le virus s'est développée dans ces souris. Conséquemment, il est mathématiquement impossible de détecter l'ARN viral six semaines post-infections sans qu'il y ait répllication du virus chez l'animal. Même en imaginant un temps de demi-vie très long tel que 5 jours, moins de 100 particules virales seraient présentes dans tout l'animal à la fin de l'expérience ce qui est bien en deçà de la limite de détection. L'analyse des résultats révèle l'importance de la tumeur pour la répllication du virus. En effet, l'ARN génomique ne peut être détecté ni dans les organes, ni dans le sérum des souris infectées qui n'ont pas de tumeur. La taille de la tumeur semble également influencer la présence du virus puisque 100% (12/12) des souris avec une grosse tumeur (plus de 0.5 g) sont positives pour le VHC et plus la taille des tumeurs diminue, plus le pourcentage de souris négatives pour le VHC augmente. Curieusement, la corrélation observée entre la taille de la tumeur et la positivité des souris pour le virus s'observe au niveau du foie des souris et non pas de la tumeur elle-même. Ainsi, seulement 18% (2/12) des souris avec une grosse tumeur étaient positives dans la tumeur bien qu'elles soient toutes positives dans le foie. Il semble que la détection du virus soit plus facile dans le foie même si la tumeur d'origine humaine est le tissu qui supporte la répllication. Un phénomène similaire a été observé lorsque nous avons analysé les résultats d'IHC puisque la protéine NS5B était détectée presque exclusivement dans les hépatocytes de la souris et non pas dans les cellules tumorales humaines. Ces résultats indiquent que la répllication du virus est au départ localisée

principalement dans les cellules tumorales mais avec le temps, une partie des hépatocytes murins deviennent infectés et répliquent le virus. Chez l'humain, la réplication du virus dans les tissus tumoraux est inférieure à celle observée dans les hépatocytes adjacents. Il est donc possible que la vitesse de réplication du virus à l'intérieur de la tumeur soit inférieure au taux de division de la cellule tumorale. Alors, le virus continue de se répliquer dans les cellules tumorales humaines mais sa concentration à l'intérieur de chacune des cellules diminue proportionnellement au taux de division de la cellule. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi la détection du virus dans les tumeurs de tailles moyennes est plus facile que la détection du virus dans les tumeurs plus grosses (66% versus 18%).

Le VHC est un virus à ARN de polarité positive et comme tous les virus de ce type, la réplication du génome viral doit nécessairement passer par la formation d'un ARN de polarité négatif servant de matrice pour la formation de l'ARN génomique. En théorie, la détection de ce brin de polarité négative est une preuve concrète de la réplication du virus dans la cellule mais, en pratique, l'amplification spécifique du brin négatif du VHC est difficile et reste grandement controversée. En effet, le rapport brin positif:brin négatif est d'environ 100:1, il faut donc pour détecter le brin négatif mettre énormément d'ARN viraux dans la réaction, ce qui entraîne de sérieux problèmes de spécificité en raison du phénomène d'auto-initiation de l'ARN «self priming» et de l'hybridation aléatoire des amorces sur les deux brins d'ARN «miss priming» qui résulte en l'amplification du brin de polarité positive au lieu du

brin de polarité négative. Pour ces raisons, la détection du brin de polarité négative est peu fiable et de moins en moins utilisée pour démontrer la réplication du VHC. La meilleure façon de démontrer la réplication du virus est par la détection et la quantification du virus dans le sang (Negro et al., 1999). La détection et quantification du virus dans le sang des patients infectés, se fait par les méthodes approuvées par le «Food and Drug Administration» qui sont le «HCV bDNA» (Chiron) ou le «Amplicor HCV Monitor™» (Roche). Puisque ces méthodes sont très dispendieuses, la plupart des études expérimentales quantifient le virus par RT-PCR en utilisant une dilution limite de l'ARN ou un standard interne d'ARN de concentration connue. Compte tenu de l'importance des résultats, nous avons quantifié le sérum des souris infectées par le VHC en utilisant la méthode la plus sensible et la plus fiable qui existe soit le «Amplicor HCV Monitor™» (Roche). Afin de s'assurer de la validité des résultats, des contrôles négatifs et positifs ont été inclus lors de chaque quantification qui se sont déroulées dans deux laboratoires externes différents (ViroMed, Mineapolis et Hopital St-Luc, Montréal). Les résultats de la quantification des sérums démontrent encore une fois l'importance de la tumeur dans l'établissement de l'infection. En effet, les souris contrôles inoculées intrahépatiquement en l'absence de cellules HuT7-3 n'ont pas de virus dans le sang et il en va de même pour les souris inoculées avec les cellules, mais qui n'ont pas développées de tumeurs. Inversement, 88% (8/9) des souris ayant développé une tumeur ont du virus dans le sang, bien que deux d'entre elles soient à la limite de

détection. L'un des objectifs de la quantification était de déterminer si la taille de la tumeur influence le titre viral dans le sang. C'est pourquoi dans la figure 2B (article 2), le titre viral est ordonné en fonction de la grosseur des tumeurs. Malheureusement, aucune corrélation claire n'a été observée. Il aurait probablement fallu quantifier un plus grand nombre de sérums afin d'augmenter la valeur statistique des résultats. Nous sommes les premiers à quantifier le niveau de réplication du virus dans le sérum chez un petit modèle animal en utilisant l'une des deux méthodes approuvées par la FDA, ce qui nous permet de comparer directement la réplication obtenue chez la souris avec celle observé chez l'humain.

Une autre façon de démontrer la réplication du virus dans la cellule est de montrer la présence de l'une des protéines nonstructurales de virus puisque celles-ci ne sont pas présentes dans les virions utilisés pour infecter les souris. Il existe plusieurs études sur l'expression des protéines du VHC à l'intérieur de la cellule. Ces études d'IHC ont démontré l'expression de la plupart des protéines virales et principalement la protéine Core et les protéines codées par la région NS5 du virus. La grande majorité des études d'IHC utilisent les anticorps produits par la compagnie Innogenetics (Belgique) qui ne sont malheureusement pas accessible commercialement. En fait, aucun des anticorps commerciaux contre le VHC ne fonctionne en IHC et les anticorps utilisables en IHC sont rares. Grâce à l'excellente collaboration avec l'hôpital St-Luc de Montréal, nous avons accès à des spécimens de foie négatifs et positifs pour le VHC, ce qui nous a permis

d'évaluer la réactivité et la spécificité en IHC d'anticorps produit dans notre laboratoire et également celles d'anticorps commerciaux. Parmi les anticorps testés, seul l'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine NS5B réagissait spécifiquement avec les spécimens humains positifs pour le VHC. Afin de réduire le bruit de fond de cet anticorps polyclonal, nous avons préadsorbé l'anticorps sur une suspension protéique provenant de cellules hépatiques humaines (HuT7-3) et murines (foie de souris nude). Les résultats obtenus sur les spécimens de souris démontrent encore une fois l'importance de la tumeur car seules les souris avec des tumeurs infectées expriment la protéine NS5B dans les hépatocytes de souris. Les souris non-infectées ou sans tumeur sont négatives pour la protéine NS5B. Les hépatocytes infectés et exprimant la protéine NS5B sont localisés majoritairement autour de la veine porte ce qui est normal puisque lorsque le virus est dans la circulation sanguine il a d'abord accès à cette région. Bien que le nombre de cellules positives en IHC pour la protéine NS5B est faible (moins de 1 %), la coloration de ces cellules est intense ce qui suggère que l'étape limitant la propagation et la réplication du virus est l'entrée.

Les résultats de l'amplification du génome virale effectuée sur les organes de souris et d'IHC suggèrent fortement que les hépatocytes murins seraient susceptibles à la réplication du virus. Alors comment ce fait-il que les souris inoculées dans le foie avec le VHC soient toutes négatives dans les organes et dans le sang? Nous pensons que la tumeur humaine infectée permet l'établissement de l'infection dans la souris et augmente le nombre de

particules virales dans l'animal. Néanmoins, la réplication du virus dans les cellules HuT7-3 *in vivo* est faible mais continue ce qui expose les hépatocytes murins au virus. Il est alors probable que l'entrée du VHC dans les hépatocytes murins soit un événement rare, causée par une entrée non spécifique du virus dans la cellule. Avec le temps un nombre grandissant d'hépatocytes murins s'infectent ce qui permet au virus d'augmenter la charge virale dans le foie de l'animal. L'entrée du virus dans les cellules murines est probablement non spécifique compte tenu du petit nombre de cellules positives en IHC. Chez l'humain, il existe un mécanisme d'entrée du virus non spécifique impliquant la liaison du virus au LDL et/ou VLDL suivi de la pénétration du complexe via le récepteur du LDL. Ce mécanisme n'est pas exclusif au VHC, mais est utilisé par d'autres virus appartenant aux Flaviviridae. Dans le cas du VHC, ce mécanisme d'entrée peut expliquer la permissivité d'un grand nombre de lignée cellulaire *in vitro*. Comme nous l'avons décrit dans l'article 2, l'homologie de séquence entre certains des récepteurs du LDL murins et humains est parfois très élevée allant jusqu'à 98% d'identité au niveau des acides aminés. Chez la souris, une portion du virus produite et libérée par les cellules humaines est probablement complexée avec les lipoprotéines de la souris, ce qui peut probablement engendrer l'entrée du virus dans les cellules murines.

Notre hypothèse de départ était que la faible réplication du VHC dans les cellules *in vitro* pourrait être augmentée par l'implantation de ces cellules dans un environnement hépatique représentant le tropisme naturel du virus.

Dans le cas présent, la réplication du virus dans les cellules HuT7-3 *in vitro* et *in vivo* est dans les deux cas faible. Puisque chez l'humain, la réplication du virus est moindre dans les cellules dédifférenciées du foie (carcinome hépatocellulaire), il est possible que les cellules HuT7-3 utilisées pour établir le modèle soient également dédifférenciées et que la réplication intrinsèque du virus dans de telles cellules est limitée par certaines caractéristiques de la cellule. Cependant, puisque la réplication du virus se propage dans les hépatocytes murins qui eux supportent la réplication active du virus, on peut concevoir une augmentation du titre viral dans le temps. Malheureusement, la tumeur induite par les cellules HuT7-3 est non régressive et à partir de la huitième semaine post-inoculation, les souris meurent d'hémorragie causée par la taille de la tumeur. C'est pourquoi, afin d'éviter des souffrances aux animaux, nous sacrifions les souris vers la sixième semaines post-implantation.

La vitesse à laquelle croît la tumeur nous empêche également de mieux caractériser la réponse humorale des souris puisque celle-ci commence à apparaître à la sixième semaine, date à laquelle les animaux sont sacrifiés. Les lymphocytes T auxiliaires qui normalement coopèrent avec les lymphocytes B pour l'activation et la sécrétion d'anticorps spécifiques sont absents chez la souris nude. Dans ce contexte, le temps nécessaire pour la production d'anticorps spécifique dirigés contre le VHC est probablement plus long. Néanmoins, il est intéressant de constater que des anticorps dirigés contre la région NS4 du virus ont été produits chez un certain nombre de

souris. Cette région code pour des protéines nonstructurales du virus et suggère nécessairement que la réplication du virus a eu lieu assez longtemps pour permettre la production des anticorps.

La motivation première derrière notre projet de recherche était le développement d'un modèle animal pour la réplication du VHC pouvant servir à la caractérisation d'agents antiviraux. Les résultats présentés dans cette dissertation montrent que nous avons effectivement élaboré un modèle animal très prometteur permettant la réplication du VHC. Cependant, la charge virale dans ce modèle semble être relativement faible et nécessite une amélioration du titre viral afin d'exploiter ce modèle animal pour la caractérisation d'agents antiviraux. Il existe plusieurs avenues envisageables afin d'augmenter la charge virale dans notre modèle animal. L'une de ces avenues est la suppression du système immunitaire de l'hôte afin de rendre la souris réceptive au virus. En effet, il est plus que probable qu'une partie plus ou moins importante des virus formés *de novo* soit éliminée suite à la pression du système immunitaire exercée contre le virus par la souris hôte. L'utilisation d'immunosuppresseur et/ou l'inhibition de la réponse antivirale induite par l'interféron peut probablement résulter en une augmentation du titre viral. L'utilisation de souris SCID ou de souris BNX reconstituées avec de la moelle osseuse de souris SCID, serait un des moyens qui permettrait l'augmentation du titre viral chez la souris (voir section 2.10). Des résultats préliminaires sur l'établissement de la tumeur orthotopique chez les souris SCID démontrent que la taille des tumeurs est plus homogène, et que les

tumeurs sont en moyenne deux fois plus grosses que chez les souris nude. Advenant une corrélation entre la taille des tumeurs et la présence du virus, il est alors probable que l'utilisation de souris SCID résulte en un plus grand nombre de souris infectées par le virus.

Il serait intéressant de voir s'il est possible d'augmenter la susceptibilité des cellules murines pour le virus par des passages successifs du virus *in vivo*. L'adaptation du virus à la souris permettrait une meilleure propagation du virus dans le foie de la souris et ainsi une augmentation du titre viral. Alternativement, si le virus utilise les lipoprotéines comme moyen de transport pour pénétrer dans la cellule, il serait intéressant d'analyser et de comparer la formation du complexe virus-lipoprotéine chez la souris et chez l'homme. Finalement, les cellules HuT7-3 utilisées pour ce modèle animal expriment de façon constitutive la polymérase d'ARN du bactériophage T7. Il est donc possible d'initier la réplication du virus *in vitro* et même *in vivo* dans les cellules HuT7-3 en utilisant un clone d'ADN complémentaire du VHC sous le contrôle transcriptionnel du promoteur T7.

La molécule CD81 permet l'attachement du virus à la cellule via l'interaction E2-CD81. Bien que l'on ignore encore si la liaison du virus à la surface cellulaire via CD81 est suffisante pour permettre l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule, il est fort probable que cette molécule ait un rôle important pour l'infection virale. En ce sens, le choix de la lignée Huh-7 est excellent puisque les cellules Huh-7 et HuT7-3 expriment CD81. En contrepartie, les

cellules Hep-G2 n'expriment pas la protéine CD81 et ne permettent pas l'attachement de la protéine E2 du VHC à la surface cellulaire (Observations personnelles; Flint et al., 1999b).

## **Conclusion**

Au cours de ce projet de recherche, nous avons établi une lignée cellulaire d'origine hépatique humaine (HuT7-3) comportant certaines caractéristiques uniques. Premièrement, les cellules HuT7-3 expriment fortement la polymérase d'ARN du bactériophage T7, ce qui permet l'expression de gènes exogènes qui sont sous le contrôle transcriptionnel du promoteur T7. L'expression constitutive de la polymérase T7 n'est pas toxique pour la cellule et n'affecte pas la croissance cellulaire. Ces cellules peuvent donc servir à l'initiation de l'infection *in vitro* à l'aide d'un clone infectieux du VHC. Deuxièmement, les cellules HuT7-3 sont tumorigéniques chez la souris et permettent la formation de tumeurs orthotopiques. Actuellement, les cellules HuT7-3 sont les seules cellules d'origines hépatiques humaines, non infectées par le VHB, à pouvoir produire des tumeurs solides orthotopiques chez la souris. Cette caractéristique nous a permis de développer un modèle orthotopique pour le cancer du foie humain et son utilisation servira à la caractérisation d'agents antitumoraux. Troisièmement, les cellules HuT7-3 sont permissives à la réplication du VHC. Grâce à ces caractéristiques, nous avons élaboré un modèle animal peu dispendieux pour l'étude de la réplication du VHC *in vivo*.

Le modèle de réplication que nous avons élaboré est original et repose sur la réplication du VHC dans les cellules hépatiques humaines qui se multiplient au sein du foie de la souris entraînant l'augmentation de la charge virale chez l'animal. Par ce mécanisme, nous avons démontré la présence du génome du VHC dans le foie, dans la tumeur ainsi que dans la circulation sanguine de

l'animal sept semaines post-infection. Nous avons également montré l'expression de la protéine non-structurale NS5B dans les hépatocytes des souris infectées confirmant ainsi la réplication du virus chez la souris. De plus, une réponse humorale a été établie contre les protéines nonstructurales du virus ce qui indique la capacité de la souris nude à produire des anticorps spécifiques en l'absence de lymphocytes T.

L'ensemble de nos résultats indique que le développement de la tumeur est indispensable pour l'établissement de l'infection. En effet, une corrélation directe a été observée entre la taille de la tumeur et la présence du virus chez l'animal. De plus, aucune réplication du virus n'a été retrouvée dans les souris n'ayant pas développé de tumeurs.

Dans leur ensemble, nos résultats démontrent clairement et pour la première fois la caractérisation de la réplication du VHC dans un modèle animal autre que le chimpanzé. Ce modèle animal démontre que la souris peut vraisemblablement servir de modèle pour la réplication du VHC ce qui permettra ultérieurement l'étude de la réplication du virus ainsi que la caractérisation d'agents antiviraux.

## Références

Agnello, A., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q.-X. (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12766-12771.

Afonso, A. M. R., Jiang, J., Penin, F., Tareau, C., Samuel, D., Petit, M.-A., Bismuth, H., Dussaix, E., and Féray, C. (1999). Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J. Virol.* 73:9213-9221.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* 69:6367-6375.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2249-2254.

Allander, T., Beyene, A., Jacobson, S. H., Grillner, L., and Persson, M. A. (1997). Patients infected with the same hepatitis C virus strain display different kinetics of the isolate-specific antibody response. *J. Infect. Dis.* 175:26-31.

Alter, H. J., Holland, P. V., Purcell, R. H., Lander, J. J., Feinstone, S. M., Morrow, A. G., and Schmidt, P. J. (1972). Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann. Intern. Med.* 77:691-699.

Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L., and Kuo, G. (1989). Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N. Eng. J. Med.* 321:1494-1500.

Asabe, S. I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1997). The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J. Virol.* 71:790-796.

Bach, N., Thung, S. N., and Schaffner, F., The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 15:572-577.

Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 67:3835-3844.

Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. (1994). Kinetic and structural analysis of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 68:5045-5055.

Bassett, S. E., Brasky, K. M., and Lanford, R. E. (1998). Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J. Virol.* 72:2589-2599.

Beard, M. R., Abell, G., Honda, M., Carroll, A., Gartland, M., Clarke, B., Suzuki, K., Lanford, R., Sangar, D. V., and Lemon, S. M. (1999). An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology* 30:316-324.

Behrens, S.-E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15:12-22.

Beld, M., Penning, M., van Putten, M., Lukashov, V., van den Hoek, A., McMorrow, M., and Goudsmit, J. (1999). Quantitative antibody responses to structural (Core) and nonstructural (NS3, NS4, and NS5) hepatitis C virus proteins among seroconverting injecting drug users: impact of epitope variation and relationship to detection of HCV RNA in blood. *Hepatology* 29:1288-1298.

Bertoletti, A., D'Elcios, M. M., Boni, C., De Carli, M., Zignego, A. L., Durazzo, M., Missale, G., Penna, A., Fiaccadori, F., Del Prete, G., and Ferrari, C. (1997). Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 112:193-199.

Bradley, D. W. (1985). The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J. Virol. Methods* 10:307-319.

Bredenbeek, P. J. (1996). The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 226:47-56.

Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13034-13039.

Bronowicki, J.-P., Lorient, M.-A., Thiers, V., Grignon, Y., Zignego, A. L., and Bréchet, C. (1998). Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology* 28:211-218.

Bukh, J., and Appgar, C. L. (1997). Five new or recently discovered (GBV-A) virus species are indigenous to new world monkeys and may constitute a separate genus of the Flaviviridae. *Virology* 229:429-436.

Bukh, J., Kim, J. P., Govindarajan, S., Apgar, C. L., Fong, S. K. H., Wages, J., Yun, A. J., Shapiro, M., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. (1998). Experimental infection of chimpanzees with hepatitis G virus and genetic analysis of the virus. *J. Infect. Dis.* 177:855-862.

Cacoub, P., Poynard, T., Ghillani, P., Charlotte, F., Olivi, M., Piette, J. C., and Opolon, P. (1999). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC group. *Multidepartment virus C. Arthritis Rheum.* 42:2204-2212.

Cerny, A., and Chisari, F. V. (1999). Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 30:595-601.

Chang, J., Yang, S.-H., Cho, Y.-G., Hwang, S. B., Hahn, Y. S., and Sung, Y. C. (1998). Hepatic C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the *H-ras* oncogene. *J. Virol.* 72:3060-3065.

Chazouilleres, O., and Wright, T. L. (1995). Hepatitis C and liver transplantation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10:471-480.

Cheng, J.-C., Chang, M.-F., and Chang, S. C. (1999). Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J. Virol.* 73:7044-7049.

Chien, D. Y., Choo, Q.-L., Ralston, R., Spaete, R., Tong, M., Houghton, M., and Kuo, G. (1993). Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. *Lancet* 342:933.

Choo, Q.-L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Berger, H. K., Thudium, K., Kuo, C., Kansopon, J., McFarland, J., Tabrizi, A., Ching, K., Moss, B., Cummins, L. B., Houghton, M., and Muchmore, E. (1994). Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1294-1298.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

Choo, Q. L., Richman, K. H., Ham, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G., and Houghton, M. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455.

Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* 72:3851-3858.

Chung, K. M., Song, O. K., and Jang, S. K. (1997). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol. Cells* 7:661-667.

Chung, R. T., Monto, A., Dienstag, J. L., and Kaplan, L. M. (1999). Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in american patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 58:353-358.

Cigan, A. M., Feng, L., and Donahue, T. F. (1988). tRNA<sup>met</sup> functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science* 242:93-97.

Clarke, B. (1997). Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 78:2397-2410.

Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.-C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1999). The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 73:2641-2649.

Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* 72:2183-2191.

Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., and Purchio, A. F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165:191-199.

Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A., and Keller, F. (1995). *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis c virus. *J. Gen. Virol.* 76:2485-2491.

D'Amico, G., and Fornasieri, A. (1995). Cryoglobulinemic glomerulonephritis: a membranoproliferative glomerulonephritis induced by hepatitis C virus. *Am. J. Kidney Dis.* 25:361-369.

Darai, G., Schwaier, A., Komotowski, D., and Munk, K. (1978). Experimental infection of *Tupaia belangari* (tree shrews) with herpes simplex virus type I and II. *J. Inf. Dis.* 137:221-226.

Das, S., Ott, M., Yamane, A., Tsai, W., Gromeier, M., Lahser, F., Gupta, S., and Dasgupta, A. (1998). A small yeast RNA blocks hepatitis C virus internal

ribosome entry site (HCV IHRES)-mediated translation and inhibits replication of a chemiric poliovirus under translational control of the HCV IRES element. *J. Virol.* 72:5638-5647.

Dash, S., Halim, A.-B., Tsuji, H., Hiramatsu, N., and Gerber, M. A. (1997). Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am. J. Pathol.* 151:363-373.

Davis, G. L., Balart, L. A., Schiff, E. R., Lindsay, K., Bodenheimer, H. C., Perillo, R. P., Carey, W., Jacobson, I. M, Payne, J., Dienstag, J. L., Vanthiel, D. H., Tamburro, G., Lefkowitz, J., Albrecht, J., Meschievitz, C., Ortego, T., Gibas, A., and the hepatitis international therapy group. (1989). Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha: a multicenter randomized, controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 321:1501-1506.

Davis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S. C., Trepo, C., Shiffman, M. L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M. H., and Albrecht, J. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International hepatitis interventional therapy group. *N. Engl. J. Med.* 339:1493-1499.

Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* 71:697-704.

Di Bisceglie, A. M. (1997). Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 26(suppl. 1):34S-38S.

Di Bisceglie, A. M., Martin, P., Kassianides, C., Lisker-Melman, M., Murray, L., Waggoner, J., Goodman, Z., Banks, S. M., and Hoofnagle, J. H. (1989). Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 321:1506-1510

Di Marzo Veronese, F., Reitz, M. S. Jr., Gupta, G., Robert-Guroff, M., Boyer-Thompson, C., Louie, A., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1993). Loss of a neutralizing epitope by a spontaneous point mutation in the V3 loop of HIV-1 isolated from an infected laboratory worker. *J. Biol. Chem.* 268:25894-25901.

Dienstag, J. I., Feinstone, S. M., Purcell, R. H., Wong, D. C., Alter, H. J., and Holland, P. V. (1977). Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1:560-562.

Dienstag, J. L., and Alter, H. J. (1986). Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin. Liver Dis.* 6:67-81.

Diepolder, H. M., Gerlach, J. T., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Jung, M. C., Wierenga, E. A., Scholz, S., Santantonio, T., Houghton, M., Southwood, S., Sette, A., and Pape, G. R. (1997). Immunodominant CD4+ T-cell epitope

within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 71:6011-6019.

Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses. *J. Virol.* 68:6147-6160.

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

Dusheiko, G., Main, J., Thomas, H., Reichard, O., Lee, C., Dhillon, A., Rassam, S., Fryden, A., Reesink, H., Bassendine, M., Norkrans, G., Cuypers, T., Lelie, N., Telfer, P., Watson, J., Weegink, C., Sillikens, P., and Weiland, O. (1996). Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J. Hepatol.* 25:591-598.

Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Maradpour, D., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J. Biol. Chem.* 273:32088-32095.

Eckart, M. R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M., and Choo, Q. L. (1993). The hepatitis C virus

encodes a serine protease involved in processing of the putative non-structural protein from the viral polyprotéine precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:399-406.

Eckels, D. D., Zhou, H., Bian, T. H., and Wang, H. (1999). Identification of antigenic escape variants in an immunodominant epitope of hepatitis C virus. *Int. Immunol.* 11:577-583.

Edwards-Smith, C. J., Jonsson, J. R., Purdie, D. M., Bansal, A., Shorthouse, C., and Powell, E. E. (1999). Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 30:526-530.

Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T., and Thiel, H. J. (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of protein p7 and E2p7. *J. Virol.* 70:4131-4135.

Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. (1996). Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* 334:77-81.

Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 96:224-230.

Esumi, M., Ahmed, M., Zhou, Y. H., Takahashi, H., and Shikata, T. (1998). Murine antibodies against E2 and hypervariable region 1 cross-reactively capture hepatitis C virus. *Virology* 251:158-164.

Esumi, M., Rikihisa, T., Nishimura, S., Goto, J., Mizuno, K., Zhou, Y. H., and Shikata, T. (1999). Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees. *Arch. Virol.* 144:973-980.

Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68:3753-3760.

Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1995). An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J. Virol.* 69:1769-1777.

Farci, P., Alter, H. J., Govindarajan, S., Wong, D. C., Engle, R., Lesniewski, R. R., Mushshawar, I. K., Desai, S. M., Miller, R. H., Ogata, N., and Purcell, R. H. (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-140.

Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M., and Purcell, R. H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7792-7796.

Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15394-15399.

Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., and Purcell, R. H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.

Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., and Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 292:767-770.

Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J. W. S., Baroudy, B. M., Lau, J. Y. N., and Hong, Z. (1999). Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymérase expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 73:1649-1654.

Fipaldini, C., Bellei, B., La Monica, N. (1999). Expression of hepatitis C virus cDNA in human hepatoma cell line mediated by a hybrid baculovirus-HCV vector. *Virology* 255:302-311.

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

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

Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., and McKeating, J. A. (1999b). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virol.* 73:6235-6244.

Frasca, L., Del Porto, P., Tuosto, L., Marinari, B., Scotta, C., Carbonari, M., Nicosia, A., and Piccolella, E. (1999). Hypervariable region 1 variants acts as

TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J. Immunol.* 163:650-658.

Fukushi, S., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F. B., Oya, A., and Katayama, K. (1997). The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 71:1662-1666.

Gale, M. Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R. and Katze, M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell Biol.* 18:5208-5218.

Gale, M. Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R., and Katze, M. G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non-structural 5A protein. *Virology* 230:217-227.

Galun, E., Burakova, T., Ketzinel, M., Lubin, I., Shezen, E., Kahana, Y., Eid, A., Ilan, Y., Rivkind, A., Pizov, G., Shouval, D., and Reisner, Y. (1995). Hepatitis C virus in SCID• BNX mouse chimera. *J. Inf. Dis.* 172-25-30.

Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T., and Pape, G. R.

(1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117:933-941.

Ghosh, A. K., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., and Ray, R. B. (1999). Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J. Gen. Virol.* 80:1179-1183.

Gorbalenya, A. E., and Koonin, E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:419-429.

Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993b). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587.

Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993c). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotéine cleavage sites. *J. Virol.* 67:2832-2843.

Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993a). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 67:1385-1395.

Gretch, D. R., Polyak, S. J., Wilson, J. J., Carithers, Jr., R. L., Perkins, J. D., and Corey, L. (1996). Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J. Virol.* 70:7622-7631.

Gwack, Y., Kim, D. W., Han, J. H., and Choe, J. (1996). Characterization of RNA binding activity and RNA hélicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:654-659.

Gwack, Y., Kim, D. W., Han, J. H., and Choe, J. (1997). DNA hélicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Eur. J. Biochem.* 250:47-54.

Hahm, B., Kim, Y. K., Kim, J. H., Kim, T. Y., and Jang, S. K. (1998). Heterogenous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* 72:8782-8788.

Haruna, Y., Hayashi, N., Kamada, T., Hytioglou, P., Thung, S. N., and Gerber, M. A. (1993). Expression of hepatitis c virus in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 73:2253-2258.

Hattori, M., Yoshioka, K., Aiyama, T., Iwata, K., Terazawa, Y., Ishigami, M., Yano, M., and Kakumu, S. (1998). Broadly reactive antibodies to hypervariable region 1 in hepatitis C virus-infected patient sera: relation to viral loads and response to interferon. *Hepatology* 27:1703-1710.

He, L. E., Alling, D., Popkin, D., Shapiro, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J. Inf. Dis.* 156:636-640.

He, X.-S., Rehmann, B., López-Labrador, F. X., Boisvert, J., Cheung, R., Mumm, J., Wedemeyer, H., Berenguer, M., Wright, T. L., Davis, M. M., and Greenberg, H. B. (1999). Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5692-5697.

Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K. (1991b). Hypervariable region in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:220-228.

Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and Shimotohno, K. (1991a). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5547-5551.

Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993b). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative non-structural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 67:4665-4675.

Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993c). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10773-10777.

Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1993a). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J. Virol.* 67:1953-1958.

Hirota, M., Satoh, S., Asabe, S., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Kato, N., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1999). Phosphorylation of nonstructural 5A protein of hepatitis C virus: HCV group-specific hyperphosphorylation. *Virology* 257:130-137.

Hirowatari, Y., Hijikata, M., Tanji, Y., Nyonoaya, H., Mizushima, H., Kimura, K., Tanaka, T., Kato, N., and Shimotohno, K. (1993). Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cells using baculovirus vector. *Arch. Virol.* 133:349-356.

Hofgärtner, W. T., Polyak, S. J., Sullivan, D. G., Carithers, R. L. Jr., and Gretch, D. R. (1997). Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in north

American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J. Med. Virol.* 53:118-126.

Honda, M., Beard, M. R., Ping, L.-H., and Lemon, S. M. (1999a). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J. Virol.* 73:1165-1174.

Honda, M., Ping, L.-H., Rijnbrand, R. C. A., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., and Lemon, S. M. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222:31-42.

Honda, M., Rijnbrand, R., Abell, G., Kim, D., and Lemon, S. M. (1999b). Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal Entry site. *J. Virol.* 73:4941-4951.

Hong, Z., Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Chase, R., Risano, C., Seelig, G., Lee, C.-G., and Kwong, A. D. (1996). Enzymatic characterization of hepatitis C virus NS3/4A complexes expressed in mammalian cells by using the herpes simplex virus amplicon system. *J. Virol.* 70:4261-4268.

Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y., and Jones, E. A. (1986). Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant alpha interferon. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 315:1575-1578.

Horie, C., Iwahana, H., Horie, T., Shimizu, I., Yoshimoto, K., Yogita, S., Tashiro, S., Ito, S., and Itakura, M. (1996). Detection of different quasispecies of hepatitis C virus core region in cancerous and noncancerous lesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:674-681.

Horijke, N., Nonaka, T., Kumamoto, I., Kajino, K., Onji, M., and Ohta, Y. (1993). Hepatitis C virus plus- and minus- strand RNA in hepatocellular carcinoma and adjoining nontumorous liver. *J. Med. Virol.* 41:312-315.

Hüssy, P., Langen, H., Mous, J., and Jacobsen, H. (1996). Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 224:93-104.

Hwang, S. B., Park, K.-J., Kim, Y.-S., Sung, Y. C., and Lai, M. M. C. (1997). Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology* 227:439-446.

Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M. B., Macioce, G., Hassan, H. J., Ponzetto, A., Clementti, M., Peschle, C., and

Carloni, G. (1997). Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected *in vitro*. *Hepatology* 26:1328-1337.

Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y., and Padmanabhan, R. (1996). Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 182:203-211.

Ito, T., and Lai, M. M. C. (1999). An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequences. *Virology* 254:288-296.

Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K., and Yasui, K. (1996). Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titer infectious virus. *J. Gen. Virol.* 77:1043-1054.

Ito, T., Tahara, S. M., and Lai, M. M. C. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* 72:8789-8796.

Jackson, R. J., and Kaminski, A. (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1:985-1000.

Jang, S. K., Kräusslich, H.-G., Nicklin, M. J. H., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' non-translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J. Virol.* 62:2636-2643.

Jin, L., and Peterson, D. L. (1995). Expression, isolation, and characterization of the hepatitis C virus ATPase/RNA hélicase. *Arch. Biochem. Biophys.* 323:47-53.

Kamer, G., and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12:7269-7282.

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

Kao, J. H., Chen, P. J., Wang, J. T., Yang, P. M., Lai, M. Y., Wang, T. H., and Chen, D. S. (1996). Superinfection by homotypic virus in hepatitis C virus carriers: studies on patients with post-transfusion hepatitis. *J. Med. Virol.* 50:303-308.

Kato, M., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., and Shimotohno, K. (1990). Molecular cloning of human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9524-9528.

Kato, N., Lan, K.-H., Ono-Nita, S. K., Shiratori, Y., and Omata, M. (1997). Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J. Virol.* 71:8856-8859.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1996). Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 68:4776-4784.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1994). Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 68:4776-4784.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraiso, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1992). Marked sequence diversity in the putative envelope protein of hepatitis C viruses. *Virus Res.* 22:107-123.

Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, S., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K. (1993). Humoral immune response to hypervariable

region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 67:3923-3930.

Kim, D. W., Gwack, Y., Han, J. H., and Choe, J. (1995). C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:160-166.

Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C., and Caron, P. R. (1998). *Structure* 6:89-100.

Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A., O'Malley, E. T., Harbeson, S. L., Rice, C. M., Murcko, M. A., Caron, P. R., and Thomson, J. A. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87:343-355.

Kim, J.-E., Song, W. K., Chung, K. M., Back, S. H., and Jang, S. K. (1999). Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch. Virol.* 144:329-343.

Kliks, S. C., Shioda, T., Haigwood, N. L., and Levy, J. A. (1993). V3 variability can influence the ability of an antibody to neutralize or enhance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11518-11522.

Kobayashi, Y., Watanabe, S., Konishi, M., Yoko, M., Katehashi, R., Kaito, M., Kondo, M., Hayashi, Y., Jomori, T., and Suzuki, S. (1993). Quantification and typing of serum hepatitis C RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *Hepatology* 18:1319-1325.

Koch, J. O., and Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J. Virol.* 73:7138-7146.

Koch, J. O., Lohmann, V., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1996). *In vitro* studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor. *Virology* 221:54-66.

Kojima, M., Osuga, T., Tsuda, F., Tanaka, T., and Okamoto, H. (1994). Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis C virus in chimpanzees. *Virology* 204:665-672.

Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277:570-574.

Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., and Rice, C. M. (1994). Specificity of the hepatitis C virus NS3 serine protease: effects of substitution at the 3/4A, 4A/4B, 4B/5A, and 5A/5B cleavage sites on polyprotéine processing. *J. Virol.* 68:7525-7533.

Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3'terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 70:3363-3371.

Komatsu, I. I., Fujisawa, T., Inui, A., Miyagawa, Y., and Onoue, M. (1997). Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon therapy in young patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *J. Med. Virol.* 53:361-365.

Koretz, R. L., Klahs, D. R., Ritman, S., Damus, K. H., and Gitnick, G. L. (1973). Post-transfusion hepatitis in recipients of blood screened by newer assays. *Lancet* 2:694-696.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108:229-241.

Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115:887-903.

Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., Tegtmeier, G. E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J. R., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244:362-364.

Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J., and Ray, R. (1998). Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J. Virol.* 72:3539-3546.

Lamonaca, V., Missale, G., Urbani, S., Pilli, M., Boni, C., Mori, C., Sette, A., Massari, M., Southwood, S., Bertoni, R., Valli, A., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1999). Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. *Hepatology* 30:1088-1098.

Lanford, R. E., Chavez, D., Chisari, F. V., and Sureau, C. (1995). Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* 69:8079-8083.

Lanford, R. E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C., and Kim, J. (1993). Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* 197:225-235.

Large, M. K., Kittlesen, D. J., and Hahn, Y. S. (1999). Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J. Immunol.* 162:931-938.

Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L.-F., Jang, S. J., Vargas, H., and Rakela, J. (1998a). Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1 correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 248:164-171.

Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L.-F., Vargas, H., and Rakela, J. (1998b). Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 28:1398-1401.

Lau, G. K. K., Davis, G. L., Wu, S. P. C., Gish, R. G., Balart, L. A., and Lau, J. Y. N. (1996). Hepatic expression of hepatitis C virus RNA in chronic hepatitis C: a study by *in situ* reverse-transcription polymérase chain reaction. *Hepatology* 23:1318-1323.

Lau, G. K. K., Fang, J. W. S., Wu, P. C., Davis, G. L., and Lau, J. Y. N. (1994). Detection of hepatitis C virus genome in formalin-fixed paraffin-

embedded liver tissue by in situ reverse transcription polymérase chain reaction. *J. Med. Virol.* 44:406-409.

Leary, T. P., Muerhoff, A. S., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Dasai, S. M., and Mushahwar, I. K.(1996). Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J. Med. Virol.* 48:60-67.

Lee, J. H., Von Wagner, M., Roth, W. K., Teuber, G., Sarrazin, C., and Zeuzem, S. (1998). Effect of ribavirin on virus load and quasispecies distribution in patients infected with hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 29:29-35.

Lee, K. J., Suh, Y.-A., Cho, Y. G., Cho, Y. S., Ha, G. W., Chung, K.-H., Hwang, J. H., Yun, Y. D., Lee, D. S., Kim, C. M., and Sung, Y.-C. (1997). Hepatitis C virus E2 protein purified from mammalian cells is frequently recognized by E2-specific antibodies in patient sera. *J. Biol. Chem.* 272:30040-30046.

Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C. (1999). Crytal structure of the RNA-dependent RNA polymérase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struc. Biol.* 6:937-943.

Levy, S., Todd, S. C., and Maecker, H. T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 16:89-109.

Li, Q., Ding, M., and Wang, H. (1995). The infection of hepatitis D virus in adult tupaia. *Chung. Hua. I. Hsueh. Tsa. Chih.* 75:611-613.

Lin, C., and Kim, J. L. (1999). Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J. Virol.* 73:8798-8807.

Lin, C., Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., McCourt, D. W., and Rice, C. M. (1994a). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* 68:5063-5073.

Lin, C., Pragai, B. M., Grakoui, A., Xu, J., and Rice, C. M. (1994b). Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: *trans*-cleavage requirements and processing kinetics. *J. Virol.* 68:8147-8157.

Lin, C., and Rice, C. M. (1995). The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7622-7626.

Lin, C., Thomson, J. A., and Rice, C. M. (1995). A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* 69:4373-4380.

Lin, C., Wu, J.-W., Hsiao, K., and Su, M. S.-S. (1997). The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J. Virol.* 71:6465-6471.

Liu, Q., Bhat, R. A., Prince, A. M., and Zhang, P. (1999). The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254:572-577.

Liu, Q., Tackney, C., Bhat, R. A., Prince, A. M., and Zhang, P. (1997). Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J. Virol.* 71:657-662.

Lo, S.-Y., Masiarz, F., Hwang, S. B., Lai, M. M., and Ou, J.-H. (1995). Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213:455-461.

Lo, S.-Y., Selby, M. J., and Ou, J.-H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J. Virol.* 70:5177-5182.

Lo, S.-Y., Selby, M., Tong, M., and Ou, J.-H. (1994). Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 199:124-131.

Lohmann, T. M., and Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of helicase-catalysed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65:169-214.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.

Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* 71:8416-8428.

Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J.-O., and Bartenschlager, R. (1998). Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology* 249:108-118.

Love, R. A., Parge, H. E., Wickersham, J. A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, Z., Adachi, T., and Hostomska, Z. (1996). The crystal structure of

hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 87:331-342.

Lu, W., Lo, S.-Y., Chen, M., Wu, K.-J., Fung, Y. K. T., and Ou, J.-H. (1999). Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 264:134-141.

Luking, A., Stahl, U., and Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:259-296.

Magrin, S., Fabiano, C., Gianguzza, F., Cutrera, M., Alaimo, G., and Pagliaro, L. (1998). HCV NS5A mutations in europeans infected by genotype 1b. *Gastroenterology* 115:244-245.

Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, J., Guardia, J., and Gómez, J. (1992). Dynamic behavior of hepatitis C quasispecies in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *J. Virol.* 68:3425-3436.

Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C virus core protein inhibits fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF- $\kappa$ B activation. *J. Virol.* 73:4713-4720.

Mason, A. L., Lau, J. Y. N., Hoang, N., Qian, K., Alexander, G. J. M., Xu, L., Guo, L., Jacob, S., Regenstein, F. G., Zimmerman, R., Everhart, J. E., Wasserfall, C., Maclaren, N. K., and Perrillo, R. P. (1999). Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333.

Mathews, M. B. (1996). Translational control. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., Sonenberg, N. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 505-548.

Matson, S. W., Bean, D. W., and George, J. W. (1994). DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays* 16:13-22.

Matsumoto, M., Hwang, S. B., Jeng, K.-S., Zhu, N., and Lai, M. M. C. (1996). Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* 218:43-51.

Matsuura, Y., Suzuki, T., Suzuki, R., Sato, M., Aizaki, H., Saito, I., and Miyamura, T. (1994). Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205:141-150.

Mellor, J., Haydon, G., Blair, C., Livingstone, W., and Simmonds, P. (1998). Low level or absent *in vivo* replication of hepatitis C virus and hepatitis G

virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 79:705-714.

Michalak, J.-P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.-C., Ung, S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 78:2299-2306.

Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M. G., Houghton, M., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1996). Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J. Clin. Invest.* 98:706-714.

Miyamura, T., and Matsuura, Y. (1993). Structural proteins of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 1:229-231.

Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995). Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J. Virol.* 69:5621-5630.

Murakami, J., Shimizu, Y., Kashii, Y., Kato, T., Minemura, M., Okada, K., Nambu, S., Takahara, T., Higuchi, K., Maeda, Y., Kumada, T., and

Watanabe, A. (1999). Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 30:143-150.

Muramatsu, S., Ishido, S., Fujita, T., Itoh, M., and Hotta, H. (1997). Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization. *J. Virol.* 71:4954-4961.

Muratori, L., Gibellini, D., Lenzi, M., Cataleta, M., Muratori, P., Morelli, M. C., and Bianchi, F. B. (1996). Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by *in situ* reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 88:2768-2774.

Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S.-I., Hirota, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* 68:6215-6222.

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med.* 4:1065-1067.

Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Koike, K. (1997). Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Vir.* 78:1527-1531.

Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H., and Shimizu, Y. K. (1996). Characterization of long-term culture of hepatitis C virus. *J. Virol.* 70:3325-3329.

Nakashima, K. Ikematsu, H., Hayashi, J., Kishihara, Y., Mitsutake, A., and Kashiwagi, S. (1995). Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA* 274:1459-1461.

Neddermann, P., Clementi, A., and 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. *J. Virol.* 73:9984-9991.

Negro, F., Krawczynski, K., Quadri, R., Rubbia-Brandt, L., Mondelli, M., Zarski, J.-P., and Hadengue, A. (1999). Detection of genomic- and minus-strand of hepatitis C virus RNA in the liver of chronic hepatitis C patients by strand-specific semiquantitative reverse-transcriptase polymérase chain reaction. *Hepatology* 29:536-542.

Nelson, D. R., Marousis, C. G., Davis, G. L., Rice, C. M., Wong, J., Houghton, M., and Lau, J. Y. N. (1997). The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J. Immunol.* 158:1473-1481.

Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., and Perelson, A. S. (1998). Hepatitis c virus dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science* 282:103-107.

Oh, J.-W., Ito, T., and Lai, M. M. C. (1999). A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymérase capable of copying the full-length viral RNA. *J. Virol.* 73:7694-7702.

Okuda, H., Obata, H., Motoike, Y., and Hisamitsu, T. (1984). Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma—comparison of hepatitis B seropositive and seronegative patients. *Hepatogastroenterology* 31:64-68.

Osmond, D. H., Padian, N. S., Sheppard, H. W., Glass, S., Shiboski, S. C., and Reingold, A. (1993). Risk factors for hepatitis C virus seropositivity in heterosexual couples. *JAMA* 269:361-365.

Ostapowicz, G., Watson, K. J. R., Locarnini, S. A., and Desmond, P. V. (1998). Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 27:1730-1735.

Pawlotsky, J.-M., Bouvier, M., Fromont, P., Deforges, L., Duval, J., Dhumeaux, D., and Bierling, P. (1995). Hepatitis C virus infection and autoimmune thrombocytopenic purpura. *J. Hepatol.* 23:635-639.

Pawlotsky, J.-M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P.-O., and Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* 72:2795-2805.

Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.

Perez-Bercoff, R. (1982). But is the 5' end of messenger RNA always involved in initiation? In: Perez-Bercoff, R. (ed). *Protein synthesis in eukaryotes*. Plenum, New York, pp 242-252.

Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., and Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal initiation of translation of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *Gene Dev.* 12:67-83.

Pieroni, L., Santolini, E., Fipaldini, C., Pacini, L., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1997). *In vitro* study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J. Virol.* 71:6373-6380.

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

Polyak, S. J., McArdle, S., Liu, S.-L., Sullivan, D. G., Chung, M., Hofgartner, W. T., Carithers, R. L. Jr., McMahon, B. J., Mullins, J. I., Corey, L., and Gretch, D. R. (1998). Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* 72:4288-4296.

Polywka, S., Schröter, M., Feucht, H.-H., Zöllner, B., and Laufs, B. (1999). Low risk of transmission of hepatitis C virus by breast milk. *Clin. Inf. Dis.* 29:1327-1329.

Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A., and Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206:750-754.

Porter, D. J. T. (1998a). A kinetic analysis of the oligonucleotide-modulated ATPase activity of the domain of the NS3 protein from hepatitis C virus. The

first cycle of interaction of ATP with the enzyme is unique. *J. Biol. Chem.* 273:14247-14253.

Porter, D. J. T. (1998b). Inhibition of the hepatitis C virus hélicase-associated ATPase activity by the combination of ADP, NaF, MgCl<sub>2</sub>, and poly(rU). Two ADP binding sites on the enzyme nucleic acid complex. *J. Biol. Chem.* 273:7390-7396.

Porter, D. J. T., Short, S. A., Hanlon, M. H., Preugschat, F., Wilson, J. E., Willard, Jr., D. H., and Consler, T. G., (1998). Product release is the major contributor to kcat for the hepatitis C virus hélicase-catalyzed strand separation of short duplex DNA. *J. Biol. Chem.* 273:18906-18914.

Poynard, T., Bedossa, P., Chevallier, M., Mathurin, P., Lemonnier, C., Trépo, C., Couzigou, P., Payen, J. L., Sajus, M., and Costa, J. M. (1995). A comparison of three doses of interferon alpha-2b regimens for the long term treatment of chronic hepatitis non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 332:1457-1462.

Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trépo, C., Albrecht, J., and the international hepatitis interventional therapy group. (1998). Randomised trial of interferon  $\alpha$ 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon

$\alpha$ 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 352:1426-1432.

Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W., and Millian, S. J. (1974). Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2:241-246.

Prince, A. M., Huima-Byron, T., Parker, T. S., and Levine, D. M. (1996). Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J. Viral. Hepat.* 3:11-17.

Provost, P. J., Ittensohn, O. L., Villarejos, V. M., Arguedas, G. J. A., and Hilleman, M. R. (1973). Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:1257-1267.

Ralston, R., Thundium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hali, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M., and Choo, Q.-L. (1993). Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 67:6753-6761.

Ray, R. B., Lagging, L. M., Meyer, K., and Ray, R. (1996a). Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* 70:4438-4443.

Ray, R. B., Lagging, L. M., Meyer, K., Steele, R., and Ray, R. (1995). Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res.* 37:209-220.

Ray, R. B., Meyer, K., and Ray, R. (1996b). Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 226:176-182.

Ray, R. B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B. B., and Ray, R. (1998). Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 273:2256-2259.

Ray, R. B., Steele, R., Meyer, K., and Ray, R. (1997). Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 272:10983-10986.

Reed, K. E., Gorbalenya, A. E., and Rice, C. M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* 72:6199-6206.

Reed, K. E., Grakoui, A., and Rice, C. M. (1995). Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage site mutagenesis and requirements for biomolecular cleavage. *J. Virol.* 69:4127-4136.

Reed, K. E., Xu, J., and Rice, C. M. (1997). Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: properties of the NS5A-associated kinase. *J. Virol.* 71:7187-7197.

Reichard, O., Norkrans, G., Fryden, A., Braconier, J. H., Sonnerborg, A., and Weiland, O. (1998). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish study group. *Lancet* 351:83-87.

Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J., and Jackson, R. J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* 14:6010-6020.

Rice, C. M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. *In*: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. ed., *Fields virology*. Revan Press, New York, NY p.931-960.

Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., and Strauss, J. H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229:726-733.

Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S., and Spaan, W. (1995). Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett.* 365:115-119.

Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin, T., Simmonds, P., Smith, D., and Stuyver, L. (1998). Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International committee on virus taxonomy. Arch. Virol.* 143:2493-2503.

Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y. N., Choo, Q.-L., Chien, D., Pireli, P., Houghton, M., and Abrignani, S. (1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: Cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1759-1763.

Ruggieri, A., Harada, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1997). Sensitization to fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 229:68-76.

Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M.-A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Inchauspé, and G., Trépo, C. (1999). Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 80:3007-3018.

Rüster, B., Zeuzem, S., and Roth, W. K. (1996). Hepatitis C virus sequence encoding truncated core proteins detected in a hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:911-915.

Saiz, J. C., Lopez-Labrador, F. X., Ampurdanes, S., Dopazo, J., Forns, X., Sanchez-Tapias, J. M., and Rodes, J. (1998). The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 177:839-847.

Sakamuro, D., Furukawa, T., and Takegami, T. (1995). Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 69 :3893-3896.

Sansonno, D., Cornacchiulo, V., Racanelli, V., and Dammacco, F. (1997). *In situ* simultaneous detection of hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus-related antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 80:22-33.

Santolini, E., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 68:3631-3641.

Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* 69:7461-7471.

Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1995). The N-terminal region of hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation with NS4A. *J. Virol.* 69:4255-4260.

Sbardellati, A., Scarselli, E., Tomei, L., Kekulé, A. S., and Traboni, C. (1999). Identification of a novel sequence at the 3' end of the GB virus B genome. *J. Virol.* 73:10546-10550.

Scarselli, E., Cerino, A., Esposito, G., Silini, E., Mondelli, M. U., and Traboni, C. (1995). Occurrence of antibodies reactive with more than one variant of the putative envelope glycoprotein (gp70) hypervariable region 1 in viremic hepatitis C virus-infected patients. *J. Virol.* 69:4407-4412.

Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Gutierrez, R. A., Heynen, C. A., Knigge, M. F., Kurpiewski, G. S., Buijk, S. L., Leary, T. P., Muerhoff, A. S., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995). Molecular and

serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J. Med. Virol.* 46:81-90.

Schlesinger, S., and Schlesinger, M. J. (1990). Replication of togaviridae and flaviviridae. *In: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. ed., Fields virology.* Revan Press, New York, NY p.697-711.

Schreiber, M., Wachsmuth, C., Muller, H., Odemuyiwa, S., Schmitz, H., Meyer, B., and Schneider-Mergener, J. (1997). The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J. Virol.* 71:9198-9205.

Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L., and Goeser, T. (1997). Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 78:2467-2476.

Selby, M. J., Glazer, E., Masiarz, F., and Houghton, M. (1994). Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204:114-122.

Sherman, K. E., O'Brien, J., Gutierrez, A. G., Harrison, S., Urdea, M., Neuwald, P., and Wilber, J. (1993). Quantitative evaluation of hepatitis C virus

RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 31:2679-2682.

Shih, C.-M. Chen, C.-M., Chen, S.-Y., and Lee, Y.-H. W. (1995). Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J. Virol.* 69:1160-1171.

Shih, J. W., Mur, J. I., and Alter, H. J. (1986). Non-A, non-B hepatitis: advances and unfulfilled expectations of the first decade. *Prog. Liver Dis.* 8:433-452.

Shimizu, Y. K., Hijikata, M., Iwamoto, A., Alter, H. J., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1994a). Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Virol.* 68:1494-1500.

Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Cabezon, T., Farci, P., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1996b). A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 223:409-412.

Shimizu, Y. K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D. C., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1998). Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J. Gen. Virol.* 79:1383-1386.

Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1992). Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5477-5481.

Shimizu, Y. K., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1993). Correlation between the infectivity of hepatitis C virus *in vitro* and its infectivity *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6037-6041.

Shimizu, Y., Yamaji, K., Masuho, Y., Yokota, T., Inoue, H., Sudo, K., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1996a). Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease. J. Virol. 70:127-132.

Shimizu, Y. K., and Yoshikura, H. (1994b). Multicycle infection of hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferons. J. Virol. 68:8406-8408.

Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. J. Virol. 73:9718-9725.

Shoji, I., Suzuki, T., Sato, M., Aizaki, H., Chiba, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999). Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology* 254:315-323.

Shrivastava, A., Manna, S. K., Ray, R., and Aggarwal, B. B. (1998). Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J. Virol.* 72:9722-9728.

Simon, D. M., Gordon, S. C., Kaplan, M. M., Koff, R. S., Regenstein, F., Everson, G., Lee, Y. M., Weiner, F., Silverman, A., Plasse, T., Fedorczyk, D., and Liao, M.-J. (1997). Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha-3: a multicenter, randomized, open-label trial. *Hepatology* 25:445-448.

Simons, J. N., Leary, T. P., Dawson, G. J., Pilot-Matias, T. J., Muerhoff, A. S., Schlauder, G. G., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995a). Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature med.* 1:564-569.

Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L., Chalmers, M. L., Van Sant, C. L., and Mushahwar, I. K. (1995b). Identification of two flavivirus-like genome in the GB hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 192:3401-3405.

Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N., and Hellen, C. U. T. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* 72:4775-4782.

Srinivas, R. V., Ray, R. B., Meyer, K., and Ray, R. (1996). Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus Res.* 45:87-92.

Steinkühler, C., Urbani, A., Tomei, L., Biasiol, G., Sardana, M., Bianchi, E., Pessi, A., and De Francesco, R. (1996). Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J. Virol.* 70:6694-6700.

Stempniak, M., Hostomska, Z., Nodes, B. R., and Hostomsky, Z. (1997). The NS3 proteinase domain of hepatitis C virus is a Zinc-containing enzyme. *J. Virol.* 71:2881-2886.

Suzich, J. A., Tamura, J. K., Palmer-Hill, F., Warrener, P., Grakoui, A., Rice, C. M., Feinstone, S. M., and Collett, M. S. (1993). Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J. Virol.* 67:6152-6158.

Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., Ando, A., Chiba, J., Harada, S., Saito, I., and Miyamura, T. (1995). Nuclear localization of the truncated hepatitis C

virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J. Gen. Vir.* 76:53-61.

Tabor, E., Gerety, R. J., Drucker, J. A., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H., Jackson, D. R., April, M., Barker, L. F., and Pineda-Tamondong, G. (1978). Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 4:463-466.

Tai, C.-L., Chi, W.-K., Chen, D.-S., and Hwang, L.-H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* 70:8477-8484.

Takimizawa, A., Mori, C., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., and Okayama, H. (1991). The structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65:1105-1113.

Tan, S.-L., Nakao, H., He, Y., Vijaysri, S., Neddermann, P., Jacobs, B. L., Mayer, B. J., and Katze, M. G. (1999). NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5533-5538.

Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.-J., and Shimotohno, K. (1995). A novel sequence found at the 3'terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:744-749.

Tanimoto, A., Ide, Y., Arima, N., Sasaguri, Y., and Padmanabhan, R. (1997). The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:360-364.

Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T., and Shimotohno, K. (1995a). Hepatitis C virus-encoded non-structural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J. Virol.* 69:1575-1581.

Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1995b). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* 69:3980-3986.

Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., and Lai, M. M. C. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110.

Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med. Microbiol. Immunol.* 182:329-334.

Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., and La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotéine. *J. Virol.* 67:4017-4026.

Tong, M. J., Blatt, L. M., Resser, K., Klein, M., and Figuero, T. (1993). Treatment of patients with chronic HCV infection with a novel type-1 interferon, consensus interferon. *Hepatology* 18:A150.

Tsai, S.-L., Liaw, Y.-F., Chen, M.-H., Huang, C.-Y., and Kuo, G. C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C chronicity. *Hepatology* 25:449-458.

Tsuboi, S., Nagamori, S., Miyazaki, M., Mihara, K., Fukaya, K., Teruya, K., Kosaka, T., Tsuji, T., and Namba, M. (1996). Persistence of hepatitis C virus RNA in established human hepatocellular carcinoma cell lines. *J. Med. Virol.* 48:133-140.

Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., and Shimotohno, K. (1997). Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'x. *J. Virol.* 71:6720-6726.

Tsukiyama-Kohara, K., Lizuka, N., Kahora, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66:1476-1483.

Tu, I. I., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. C. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263:30-41.

Tumminelli, F., Marcellin, P., Rizzo, S., Barbera, S., Corvino, G., Furia, P., Benhamou, J-P., and Erlinger, S. (1995). Shaving as potential source of hepatitis C virus infection. *Lancet* 45:658.

Urbani, A., Bazzo, R., Nardi, M. C., Cicero, D. O., De Francesco, R., Steinkuhler, C., and Barbato, G. (1998). The metal binding site of the hepatitis C virus NS3 protease. A spectroscopic investigation. *J. Biol. Chem.* 273:18760-18769.

Van Doorn, L.-J., Capriles, I., Maertens, G., DeLeys, R., Murray, K., Kos, T., Schellekens, H., and Quint, W. (1995). Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *J. Virol.* 69:773-778.

Walker, F. M., Dazza, M.-C., Dauge, M.-C., Boucher, O., Bedel, C., Henin, D., and Lehy, T. (1998). Detection and localization by *in situ* molecular biology techniques and immunohistochemistry of hepatitis C virus in livers of chronically infected patients. *J. Histochem. Cytochem.* 46:653-660.

Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I., and Blum, H. E. (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 24:1-5.

Wang, C., Le, S., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* 1:526-537.

Wang, H., and Eckels, D. D. (1999). Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the non-structural 3 protein of hepatitis C virus have potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J. Immunol.* 162:4177-4183.

Watanabe, K., Yoshioka, K., Ito, H., Watanabe, K., Ishigami, M., Takagi, K., Utsunomiya, S., Kobayashi, M., Kishimoto, H., Yano, M., and Kakumu, S. (1999). The hypervariable region 1 protein of hepatitis C virus broadly reactive with sera of patients with chronic hepatitis C has a similar amino acid sequence with the consensus sequence. *Virology* 264:153-158.

Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., Brunetto, M., Barr, P. J., Miyamura, T., McHutchinson, J., and Houghton, M. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3468-3472.

Wienhues, U., Ihlenfeldt, H.-G., Seidel, C., Schmitt, U., Kraas, W., and Jung, G. (1998). Characterization of a linear epitope in the nonstructural region 4 of hepatitis C virus with reactivity to seroconversion antibodies. *Virology* 245:281-288.

Wilson, J. J., Polyak, S. J., Day, T. D., and Gretch, D. R. (1995). Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasispecies by heteroduplex gel shift analysis: correlation with nucleotide sequencing. *J. Gen. Virol.* 76:1763-1771.

Wyatt, C. A., Andrus, L., Brotman, B., Huang, F., Lee, D.-H., and Prince, A. M. (1998). Immunity in chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus: role of minor quasispecies in reinfection. *J. Virol.* 72:1725-1730.

Xie, Z.-C., Riezu-Boj, J.-I., Lasarte, J.-J., Guillen, J., Su, J.-H., Civeira, M.-P., and Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244:513-520.

Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S., and Rice, C. M. (1997). Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71:5312-5322.

Yamashita, T., Kaneko, S., Shirota, Y., Qin, W., Nomura, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (1998). RNA-dependent RNA polymérase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 273:15479-15486.

Yan, Y., Munshi, S., Sardana, V., Blue, J., Johns, B., Cole, J., Steinkuheler, C., Tomei, L., De Francesco, R., Kuo, L., and Chen, Z. (1998). Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 angstrom resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* 7:837-847.

Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U., and Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8738-8743.

Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U., and Bukh, J. (1999b). Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology* 262:250-263.

Yanagi, M., St-Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1999a). *In vivo* analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after *in vitro* mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2291-2295.

Yanagi, M., St-Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1998). Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious *in vivo*. *Virology* 244:161-172.

Yao, N., Heson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V., and Weber, P. C. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA hélicase domain. *Nat. Struc. Biol.* 4:463-467.

Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.-I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., and Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72:6048-6055.

Yoo, B. J., Selby, M. J., Choe, J., Suh, B. S., Choi, S. H., Joh, J. S., Nuovo, G. J., Lee, H.-S., Houghton, M., and Han, J. H. (1995). Transfection of a

differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with *in vitro*-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. *J. Virol.* 69:32-38.

You, L.-R., Chen, C.-M., and Lee, Y.-H. W. (1999). Hepatitis C virus core protein enhances NF- $\kappa$ B signal pathway triggering by lymphotoxin- $\beta$  receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J. Virol.* 73:1672-1681.

Yuan, Z.-H., Kumar, U., Thomas, H. C., Wen, Y.-M., and Monjardino, J. (1997). Expression, purification, and partial characterization of HCV RNA polymérase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:231-235.

Zan, M. Y., Liu, C. B., Li, C. M., Zhang, W. Y., Zhu, C., Pang, Q. F., Zhao, T. X., Wang, G., and Wang, J. L. (1981). A preliminary study of hepatitis A virus infection of Chinese tupaia. *Acta Acad. Med. Sin.* 3:148-152.

Zehender, G., Meroni, L., De Maddalena, C., Varchetta, S., Monti, G., and Galli, M. (1997). Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J. Inf. Dis.* 176:1209-1214.

Zhou, Y.-H., Moriyama, M., and Esumi, M. (1999). Multiple sequence-reactive antibodies induced by a single peptide immunization with hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Virology* 256:360-370.

Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., and Lai, M. M. C. (1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J. Virol.* 72:3691-3697.

Zibert, A., Screier, E., and Roggendorf, M. (1995). Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 208:653-661.

Zignego, A. L., Macchia, D., Monti, M., Thiers, V., Mazzetti, M., Foschi, M., Maggi, E., Romagnani, S., Gentilini, P., and Bréchet, C. (1992). Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 15:382-386.

Zimmermann, R., Perucchini, D., Fauchère, J-C., Joller-Jemelka, H., Geyer, M., Huch, R., and Huch, A. (1995). Hepatitis C virus in breast milk. *Lancet* 345:928.

## Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mon directeur de thèse, le Dr. Samir Mounir. J'ai rencontré le Dr. Mounir pour la première fois en 1992, c'était le tout premier jour d'un stage d'été effectué durant mon baccalauréat. Il m'a alors expliqué mon projet brièvement puis, il m'a fait plaisir en me laissant exécuter mon premier PCR. Depuis ce jour, j'ai toujours eu beaucoup d'admiration et de respect pour cet homme qui travail sans arrêt pour l'amour de la science.

Durant toutes ces années d'études, mon épouse Nathalie a hérité de responsabilités qui, dans un couple normal, aurait dû être partagées. Je la remercie infiniment pour tout les sacrifices qu'elle a fait.

Je remercie Biochem Pharma Inc pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et pour avoir supporté mes travaux de recherches.

Je remercie également les Dr. Marc Bilodeau et Bernard Willems de l'hôpital Saint-Luc de Montréal pour leurs excellentes collaborations.

Finalement, je salut tout les employés du département de virologie de Biochem Pharma qui ont interagit directement ou indirectement avec moi.