

Université de Montréal

**Étude de l'implication de la protéine F du virus de
l'hépatite C dans le développement de pathologie
hépatique chez deux lignées de poissons zébrés
transgéniques**

par

Amélie Pagliuzza

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie

Novembre 2012

© Amélie Pagliuzza, 2012

Résumé

La protéine core du virus de l'hépatite C (VHC) serait responsable des principaux effets pathogènes du VHC, dont le développement de fibrose, stéatose, cirrhose et carcinome hépatocellulaire. Un cadre de lecture alternatif existe dans le gène de core, permettant la synthèse d'une autre protéine appelée ARFP (pour *alternatate reading frame protein*) ou protéine F (pour *frameshift*), dont le rôle reste encore mal compris. La présence de la protéine F lors de l'étude des fonctions biologiques de core ne pouvant être exclue, il est possible que certains rôles attribués à core reflètent en réalité l'activité de la protéine F. Afin de déterminer les fonctions biologiques de la protéine F dans les hépatocytes et son influence dans la pathogenèse associée au VHC, nous avons généré des lignées transgéniques de poissons zébrés (*Danio rerio*) dans lesquelles l'expression de deux versions de la protéine F (AF11_{opti} et AUG26_{opti}) a été ciblée au foie par l'utilisation du promoteur de la *liver fatty acid binding protein* (L-FABP). Le phénotype des poissons transgéniques de génération F2 a été analysé au niveau morphologique, histologique et microscopique afin de rechercher des signes de pathologie hépatique. Nos résultats ont démontré l'implication de la protéine F dans le développement de stéatose hépatique chez les deux lignées transgéniques, mais aucun signe de fibrose ou d'oncogenèse n'a été détecté. L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'accumulation lipidique induite par la protéine F pourrait permettre de mieux comprendre son rôle dans la pathogenèse du VHC, et mener au développement de nouvelles stratégies antivirales.

Mots-clés : VHC, ARFP, protéine F, poisson zébré, transgénèse, stéatose hépatique

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) core protein is thought to be responsible for the major pathogenic effects of HCV, including the development of fibrosis, steatosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. An alternate translational open reading frame exists in the core gene that allows the synthesis of another protein called ARFP (*alternate reading frame protein*) or F protein (*frameshift*), the role of which remains poorly understood. Since we cannot exclude the presence of F protein in most studies of core biological functions, it is possible that the roles attributed to core reflect the activity of ARFP. To determine the biological functions of F protein in hepatocytes and their influence on HCV-associated pathogenesis, we generated transgenic lines of zebrafish (*Danio rerio*) in which the liver fatty acid binding protein (L-FABP) promoter was used to direct liver-specific expression of two forms of ARFP (AF11_{opti} and AUG26_{opti}). The phenotype of F2 transgenic zebrafish was analyzed for morphological, histological and microscopic signs of liver-associated pathology. Our results demonstrated the implication of the HCV F protein in the development of hepatic steatosis in transgenic zebrafish liver but not fibrosis or oncogenesis. Identification of the cellular and molecular mechanisms underlying F protein-induced lipid accumulation will lead to a better understanding of the role of ARFP in HCV-associated pathology, which could lead to the development of novel antiviral strategies.

Keywords: HCV, ARFP, F protein, zebrafish, transgenesis, hepatic steatosis

Table des matières

Introduction.....	1
1.1 Épidémiologie et modes de transmission du VHC	1
1.2 Histoire naturelle de l'infection	1
1.3 Traitements	4
1.4 Biologie moléculaire du virus.....	4
1.4.1 Généralités	4
1.4.2 Cycle de réplication	7
1.4.3 La protéine core	10
1.4.4 La protéine F ou ARFP.....	13
1.5 Modèles d'études du VHC.....	19
1.5.1 Modèles <i>in vitro</i>	19
1.5.2 Modèles <i>in vivo</i>	22
1.6 Le poisson zébré	25
1.6.1 Génétique et transgénèse.....	25
1.6.2 Le poisson zébré et les pathologies hépatiques.....	28
1.7 Hypothèse et objectifs.....	29
Article	31
Contribution à l'article.....	31
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Materials and methods	36
Results.....	39
Discussion.....	41
Acknowledgements.....	55
References.....	55
Discussion.....	63
Conclusion	68
Bibliographie.....	69

Liste des tableaux

Table I. Primer sequences used in PCR, RT-PCR and quantitative real-time PCR. 46

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Histoire naturelle de l'infection.....	3
Figure 2. Organisation génomique du VHC.....	6
Figure 3. Cycle de réplication du VHC.....	9
Figure 4. Interactions de la protéine core avec les voies de signalisation de la cellule-hôte....	12
Figure 5. Modes d'expression de la protéine F.....	15
Figure 6. Modèles d'étude <i>in vitro</i> du VHC.....	21
Figure 7. Stratégies pour générer des modèles de souris pour l'étude <i>in vivo</i> du VHC.....	24
Figure 8. Transgénèse <i>Tol2</i>	27

Article

Figure 1. Transgenesis constructs.....	47
Figure 2. Sequences encoding ARFPs.....	48
Figure 3. Codon optimization of ARFP sequences.....	49
Figure 4. Transgene integration and ARFP expression.....	50
Figure 5. Histological analysis of the liver.....	51
Figure 6. Accumulation of LDs in hepatocytes.....	52
Figure 7. Evaluation of fibrosis in transgenic fish.....	53
Figure 8. Expression of oncogenesis marker genes.....	54

Liste des abréviations

AcGFP	<i>Aequorea coerulea green fluorescent protein</i>
ALD	<i>alcoholic liver disease</i>
ARFP	<i>alternate reading frame protein</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CHC	carcinome hépatocellulaire
DAA	<i>direct-acting antiviral</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EM	<i>electron microscopy</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GL	gouttelette lipidique
H&E	<i>hematoxylin & eosin</i>
HBV	<i>hepatitis B virus</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCV	<i>hepatitis C virus</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IFN	interféron
IL	interleukine
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JFH-1	<i>Japanese fulminant hepatitis 1</i>
LD	<i>lipid droplet</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
L-FABP	<i>liver fatty acid binding protein</i>
LVP	<i>lipoviral particles</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>

MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTP	<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NTR	<i>non-translated region</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ORO	<i>oil red o</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPAR α/γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor α/γ</i>
RE	<i>réticulum endoplasmique</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RXR- α	<i>retinoid X receptor α</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SVR	<i>sustained virological response</i>
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>
TG	<i>triglycerides</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
VHB	<i>virus de l'hépatite B</i>
VHC	<i>virus de l'hépatite C</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WT	<i>wild-type</i>

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Hugo Soudeyns, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et confié ce projet de recherche qui m'a permis d'acquérir de très bonnes bases de travail en laboratoire et d'apprendre de nombreuses techniques. Il m'a donné sa confiance, a fait preuve d'une grande patience, et m'a toujours donné de bons conseils au cours de ma maîtrise.

Merci à Mathieu et à Marion d'avoir apporté leur contribution à ce projet.

Kessen et Charlotte m'ont beaucoup aidée dans mes expériences et m'ont appris à maîtriser de nouvelles techniques. Marie-Claude m'a conseillée et soutenue pour la rédaction de ce mémoire. Ces trois personnes sont aujourd'hui des amis qui me sont très chers, et je tiens à les remercier de tout cœur.

Je me tourne ensuite vers Thomas, qui me soutient et croit en moi quoiqu'il arrive. Il m'a été d'une grande aide pour l'aboutissement de cette maîtrise, me guidant dans mes réflexions, et me donnant toujours de judicieux conseils. Il m'a empêchée de baisser les bras et a su me donner confiance en moi.

Enfin, je dis un grand merci à mes parents sans qui je n'aurais pas pu en arriver jusqu'ici et qui, malgré l'éloignement, me soutiennent chaque jour.

Introduction

1.1 Épidémiologie et modes de transmission du VHC

Le virus de l'hépatite C (VHC) est une cause majeure d'hépatite chronique dans le monde, avec près de 170 millions d'individus infectés (soit 3% de la population mondiale) (Alter et Seeff, 2000). La prévalence varie selon les régions du monde. Les pays en développement sont les plus touchés, particulièrement l'Égypte dont 22% de la population est infectée. Cependant, les pays industrialisés ne sont pas épargnés : on estime que 3 millions d'individus sont chroniquement infectés en Amérique du Nord. Le VHC se transmet par le sang, notamment lors de transfusion sanguine ou greffe de donneur infecté, d'injection avec du matériel contaminé, ou encore par transmission mère-enfant (Alter, 1997; Thomas et al., 1998). Le manque d'hygiène lors de pratiques médicales et l'absence de dépistage du virus sont les causes majeures d'infection dans les régions en développement, alors que dans les pays occidentaux, l'utilisation de drogues injectables constitue la voie de transmission principale.

1.2 Histoire naturelle de l'infection

La phase aiguë de l'infection se manifeste 6 à 8 semaines après avoir été exposé au virus et demeure la plupart du temps asymptomatique. Seule une faible proportion des individus infectés arrive à éliminer l'infection, mais dans 85% des cas, la persistance du virus mène à l'établissement d'une infection chronique. La maladie peut alors progresser durant 20 à 30 ans vers des stades plus avancés de dommages hépatiques, aboutissant au développement de cirrhose dans 20% des patients, parmi lesquels 25% évolueront vers le stade du carcinome hépatocellulaire (CHC) (Alter, 1995). En raison du nombre important de patients chroniquement infectés, l'hépatite C est la cause principale de greffe de foie en Amérique du Nord. La progression de la pathologie peut être accélérée par plusieurs cofacteurs, comme le sexe, l'âge, l'obésité, la surconsommation d'alcool, ou encore la co-infection avec le virus de

l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Figure 1) (Shepard et al., 2005).

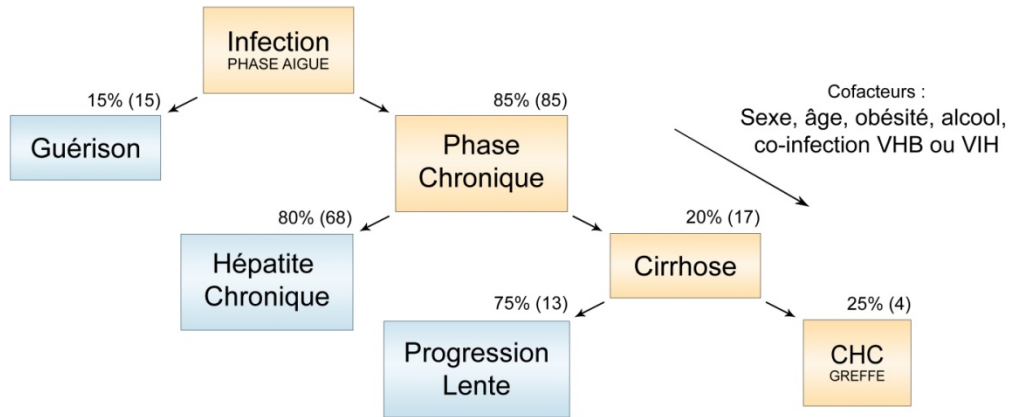


Figure 1. Histoire naturelle de l'infection.

Représentation de l'évolution de l'infection au VHC. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'individus sur 100 individus infectés initialement (Adapté de Alter, *Seminars in liver disease*, 1995).

1.3 Traitements

Il n'existe toujours pas de vaccin pour prévenir l'infection au VHC et les traitements thérapeutiques actuellement disponibles n'ont qu'une efficacité restreinte. En effet, le traitement standard, qui consiste en une combinaison d'interféron- α pégylé (Peg-IFN α) et de ribavirine, induit une réponse virologique soutenue (SVR, *sustained virological response*) pour 80% des patients infectés avec le génotype 2 et 3 mais pour seulement 50% dans le cas du génotype 1, le plus prévalent en Amérique du Nord et en Europe (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Manns et al., 2001). L'avancement des connaissances sur le cycle de vie du VHC et sur les fonctions biologiques des protéines virales a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, des agents antiviraux ciblant directement les protéines du virus ont été développés (DAA, *direct-acting antiviral*). Récemment, l'ajout d'inhibiteur de protéase virale (telaprevir ou boceprevir) à la thérapie standard a amélioré le taux de réponse, même si les effets adverses dus à l'IFN et à la ribavirine persistent (Welsch et al., 2012). L'utilisation des DAAs sans IFN a également été envisagée. Cependant, le VHC est capable de muter rapidement et devenir résistant aux DAAs (Rong et al., 2010). La combinaison de plusieurs de ces agents permettrait de réduire les risques d'apparition de résistance. Des stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de facteurs de l'hôte nécessaires à la réplication du virus (microARN 122 et cyclophilines) sont également en cours de développement (Coelmont et al., 2010; Lanford et al., 2010).

1.4 Biologie moléculaire du virus

1.4.1 Généralités

Le VHC est un membre du genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. En raison de sa haute variabilité génétique, trois niveaux de classification ont été définis : génotypes (numérotés de 1 à 7), sous-types (a, b, c, etc) et quasiespèces (variantes présentes au sein d'un individu infecté) (Simmonds et al., 2005). Cette hétérogénéité permet au virus de développer une résistance face aux thérapies antivirales et à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le génome du VHC est une molécule d'ARN simple brin de 9.6 kb et de polarité positive qui encode une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Figure 2) (Moradpour et al., 2007). Ce long cadre de lecture est bordé en 5' et 3' par des régions non codantes (5' NTR et 3'NTR pour *non-translated regions*), qui comportent toutes deux des structures d'ARN agissant en *cis* qui sont essentielles à la réplication virale. La région 5'NTR contient notamment le site d'entrée interne du ribosome (IRES pour *internal ribosome entry site*) permettant l'initiation de la traduction coiffe-indépendante du génome viral (Friebe et al., 2001; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). La polyprotéine ainsi produite est ensuite clivée co- et post-traductionnellement par des protéases virales et cellulaires pour générer les composantes structurales du virion (core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), la viroporine p7, ainsi que 6 protéines non-structurales (NS2, NS3, NS4A-B, NS5A-B). La plupart de ces protéines virales sont multifonctionnelles, car elles sont impliquées à la fois dans la réplication et l'assemblage du virus ainsi que dans la pathogenèse et la persistance virale.

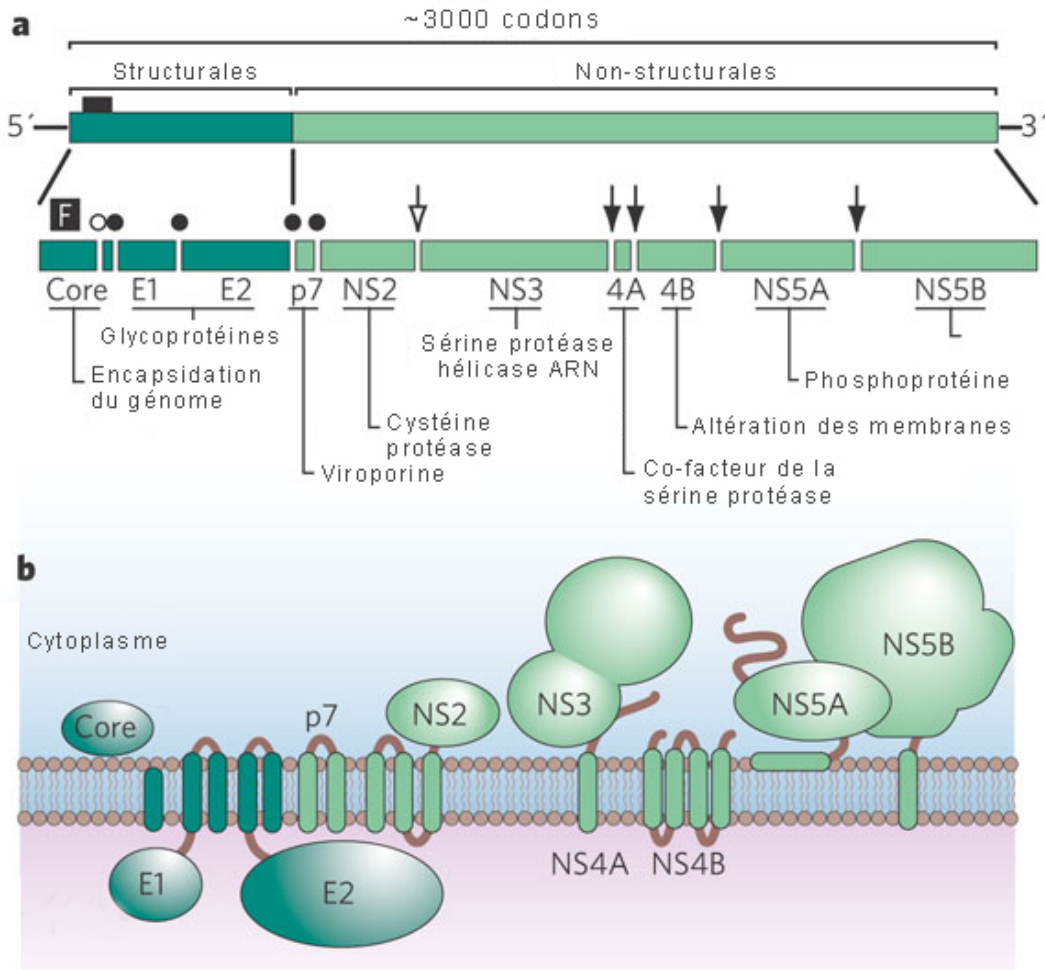


Figure 2. Organisation génomique du VHC.

(a) Le génome du VHC est composé d'un long cadre de lecture d'environ 3000 codons bordé par des régions 5' et 3' non-codante (5' NTR et 3'NTR). La polyprotéine, représentée en-dessous du génome viral, est clivée en protéines structurales et non-structurales matures. Les ronds noirs indiquent les sites de clivages des signal-peptidases, et le rond blanc, celui des signal-peptide peptidases. La jonction NS2/3 est clivée par l'autoprotéase NS2 (flèche blanche), tandis que les autres protéines non-structurales sont clivées par la sérine-protéase NS3-4A (flèches noires). (b) Topologie des protéines virales associées aux membranes. (Adapté de Lindenbach, *Nature*, 2005).

1.4.2 Cycle de réplication

Les particules virales (40-70 nm de diamètre) peuvent circuler sous plusieurs formes, l'association aux lipoprotéines de faible ou très faible densité (LDL, *low-density lipoprotein* ou VLDL, *very-low density lipoprotein*) étant la forme infectieuse. Ces particules, aussi appelées *lipoviral particles* (LVP), infectent les hépatocytes par interaction avec plusieurs récepteurs membranaires. Selon le modèle actuel (Figure 3), la LVP se lie dans un premier temps au récepteur au LDL (LDL-R), aux glycoaminoglycanes (GAGs), et au *scavenger receptor* de classe B et de type I (SR-BI), qui est un des récepteurs des lipoprotéines de haute densité (HDL, *high-density lipoprotein*). Puis, les protéines d'enveloppe du VHC (E1 et E2) interagissent avec la tétraspanine CD81, les molécules claudine-1 et occludine avant l'étape d'endocytose clathrine-dépendante (Ploss et Evans, 2012).

Les étapes de fusion de la membrane endosomale et de décapsidation sont encore mal définies, mais seraient probablement médiées par l'acidification de l'endosome. Une fois relâché dans le cytosol de la cellule-hôte, l'ARN viral est traduit *via* le site interne d'entrée du ribosome (IRES). La polyprotéine ainsi produite s'associe au réticulum endoplasmique (RE) et subit une série de clivages pour générer les protéines virales. Des protéases de l'hôte vont permettre de libérer les protéines structurales core, E1 et E2 ainsi que la viroporine p7. Le complexe NS2-3 s'autoclive pour relâcher la sérine protéase NS3 qui, à l'aide de son cofacteur NS4A, va pouvoir procéder au clivage des autres protéines non-structurales. NS3 exerce également une activité ARN-hélicase et nucléoside triphosphatase (NTPase). NS4B procure une structure de soutien au complexe de réplication du VHC en engendrant la formation d'un réseau membranaire au sein de la cellule-hôte (Egger et al., 2002). NS5A est impliquée dans la réplication et l'assemblage viral, mais sa fonction exacte est peu connue. Enfin, NS5B sert d'ARN-polymérase ARN-dépendante (Moradpour et al., 2007). Les diverses protéines non-structurales s'assemblent pour former le complexe de réplication qui demeure associé aux membranes dérivées du RE. Les brins d'ARN nouvellement synthétisés sont soit utilisés pour la traduction et réplication, soit recrutés à proximité des gouttelettes lipidiques (GL), qui constituent la plateforme d'assemblage des particules virales. Il y a alors encapsidation de l'ARN viral, incorporation des protéines E1 et E2 à la surface de l'enveloppe lipidique formée par la gouttelette bourgeonnante, et exocytose de la LVP ainsi formée *via* la voie de sécrétion

du VLDL. Tous les mécanismes régissant ces dernières étapes du cycle viral n'ont pas encore été découverts, et plusieurs aspects restent largement incompris.

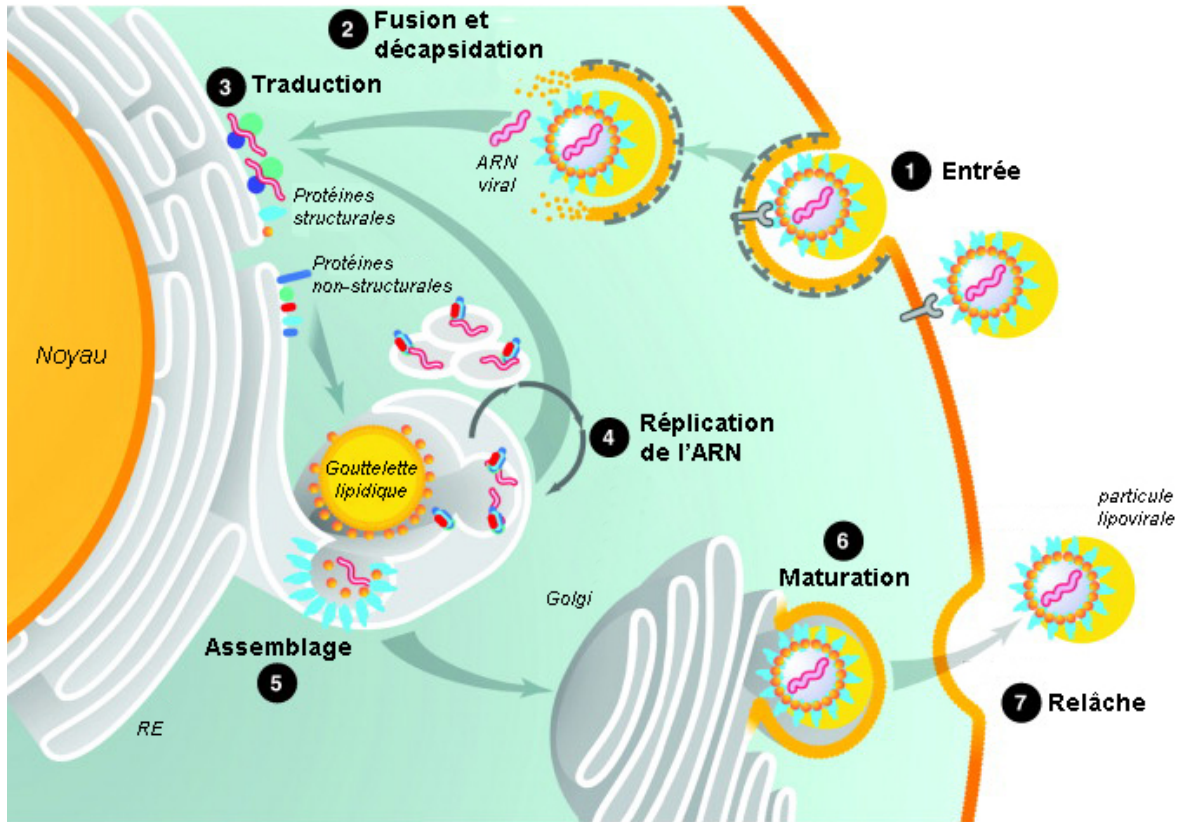


Figure 3. Cycle de réplication du VHC.

Après interaction avec les récepteurs de surface de la cellule-hôte, le virus associé à une lipoprotéine est internalisé (1) puis décapsidé, libérant ainsi l'ARN viral dans le cytoplasme (2). La polyprotéine est ensuite traduite puis clivée en protéines structurales et non-structurales matures (3). La réplication de l'ARN viral s'opère au sein d'un réseau membranaire, généré en partie par l'action de NS4B (4). S'ensuivent les étapes d'encapsidation et d'assemblage à proximité des GL bourgeonnantes (5). Après maturation (6), les virions (particules lipovirales) sont ensuite relâchés à l'extérieur de la cellule (7) (Adapté de Herker et Ott, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2011).

1.4.3 La protéine core

La protéine core constitue les 191 premiers acides aminés de la polyprotéine virale. La protéine mature de 21 kDa, formée suite à deux clivages par des signal-peptidases et signal-peptide peptidases, compose la nucléocapside virale. En plus de son rôle structural, la protéine core joue un rôle majeur dans la pathogenèse virale. En effet, plusieurs études ont démontré son implication dans la perturbation de nombreuses voies de signalisation de la cellule-hôte, altérant ainsi ses fonctions biologiques à différents niveaux (Figure 4). Elle est notamment capable d'induire l'apoptose des hépatocytes en interférant avec la voie du Fas (Hahn et al., 2000; Moorman et al., 2003) et du TNF α (*tumor necrosis factor α*) (Ray et al., 1998; Zhu et al., 1998), promouvant ainsi la propagation virale au sein de l'individu infecté. Mais core peut également prévenir l'apoptose induite par ces facteurs *via* l'activation de NF κ B (Disson et al., 2002; Marusawa et al., 1999) ou peut inhiber la relâche du cytochrome c par les mitochondries (Machida et al., 2001).

La protéine core semble également jouer un rôle important dans le développement de CHC en modulant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes. Des études ont révélé que core est capable d'accroître l'activité du suppresseur de tumeur p53 en augmentant son affinité de liaison à l'ADN et sa capacité de transcription (Otsuka et al., 2000), mais peut également l'inhiber en réprimant l'activité transcriptionnelle de son promoteur (Ray et al., 1997). La régulation positive des oncogènes c-myc et wnt1 par la protéine core induit la prolifération cellulaire et donc l'apparition de cellules tumorales. De plus, core peut provoquer cette transformation en activant le facteur de transcription STAT3 (Yoshida et al., 2002).

Par ailleurs, la protéine core est impliquée dans la perturbation du métabolisme lipidique et serait donc en partie responsable du développement de stéatose hépatique. En effet, core interagit avec la diacylglycérol acyltransférase-1 (DGAT1), qui joue un rôle central dans la biosynthèse des GL, pour atteindre la surface de ces dernières et initier la production des particules virales (Herker et al., 2010). La liaison de core avec Apo AII, un composant des HDL, aide la formation de la capsid virale lors de l'assemblage viral (Sabile et al., 1999). Le recrutement des GL au site d'assemblage serait également dû à l'activité de core, qui induirait la redistribution de ces organelles *via* le réseau de microtubules (Boulant et al., 2008). De plus, il a été démontré que core inhibe l'activité du *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP),

une protéine clé dans le transfert de lipides, menant à l'accumulation de lipides intracellulaires et à l'inhibition de la sécrétion de VLDL (Perlemuter et al., 2002). L'expression de core provoque aussi, de façon directe ou indirecte, l'altération de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras, comme SREBP ou PPAR α/γ (Kim et al., 2007). Core interagirait également avec le récepteur x des rétinoïdes α (RXR- α), qui est lié à la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Tsutsumi et al., 2002). Enfin, core pourrait contribuer au développement de stéatose en causant un stress oxydatif, par inhibition de la β -oxydation et l'induction de dommages mitochondriaux (Okuda et al., 2002).

Enfin, le développement de stéatose et de CHC ont été observés chez des souris transgéniques exprimant la protéine core, confirmant l'implication de cette protéine dans la pathogenèse associée à l'infection au VHC (Lerat et al., 2002; Moriya et al., 1998, 1997).

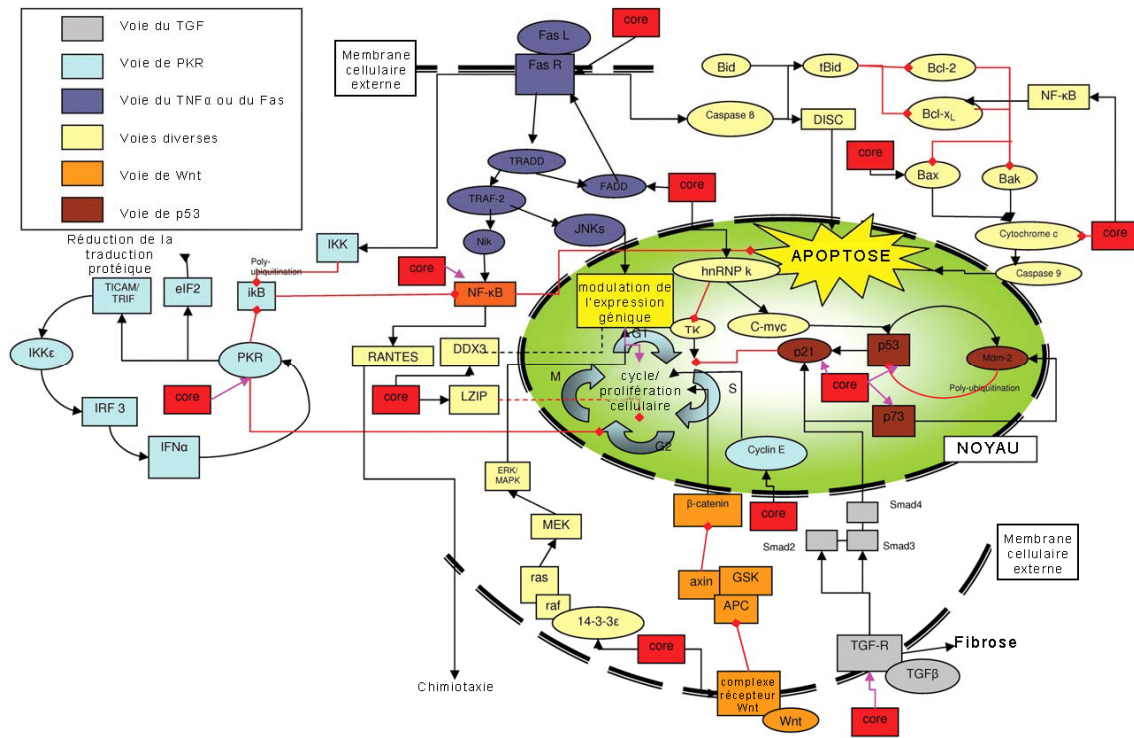


Figure 4. Interactions de la protéine core avec les voies de signalisation de la cellule-hôte.

Représentation schématique des voies de signalisation affectées par la protéine core *via* des mécanismes d'inhibition (flèches rouges) ou d'activation (flèches noires). Les flèches mauves indiquent l'activation ou la répression. (Adapté de Tran, *Bioscience Horizons*, 2008)

1.4.4 La protéine F ou ARFP

1.4.4.1 Découverte de la protéine F

Des analyses bio-informatiques ont révélé un haut degré de conservation de la séquence codant pour la protéine core, malgré la forte hétérogénéité génétique que présente le génome du VHC (Ina et al., 1994; Smith and Simmonds, 1997). On a d'abord pensé que cette contrainte fonctionnelle était due à la présence de structures secondaires de l'ARN dans cette région. C'est en 2001 que deux groupes de recherche distincts ont rapporté la présence d'un cadre de lecture alternatif dans le gène de core, aboutissant à la production d'une nouvelle protéine virale de 16-17 kDa, nommée F (*frameshift*), ARFP (*alternate reading frame protein*) ou encore core+1 (Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). La séquence d'acides aminés de cette protéine est très bien conservée au sein des différents génotypes du VHC (Walewski et al., 2001), même si son niveau de conservation est légèrement inférieur à celui de la protéine core (Walewski et al., 2002). Walewski et al. ont prouvé indirectement la présence de la protéine *in vivo* en montrant la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum de patients infectés par le VHC par l'utilisation de peptide correspondant à la séquence protéique du cadre +1 comme antigène (Walewski et al., 2001).

1.4.4.2 Formes alternatives de la protéine F et évidence de leur présence *in vivo*

À ce jour, même si la présence de la protéine F est évidente, il n'existe toujours pas de consensus quant à son mode de production (Figure 5). Initialement, l'équipe de Walewski et celle de Xu ont montré que la protéine F était produite par initiation de la traduction au codon AUG de la polyprotéine suivie d'un glissement ribosomal -2/+1 au codon 8-11, qui constitue une région riche en adénosine (Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). En effet, il a été démontré dans plusieurs études que la présence de ces 10 adénosines consécutives est requise pour que ce changement de cadre de lecture s'effectue. Cependant, cette séquence est absente ou interrompue dans de nombreuses séquences génomiques de VHC, notamment dans la souche HCV-1a utilisée lors de l'étude démontrant pour la première fois la présence de la protéine alternative sur les lysats de réticulocytes de lapin (Varaklioti et al., 2002). Boulant et

ses collaborateurs ont proposé la théorie d'un glissement ribosomal indépendant de la succession des 10 adénosines qui se produirait au codon 42, avec une possibilité de rephasage dans le cadre -1 au niveau du codon 144 (Boulant et al., 2003). Ces données ayant été générées chez *E.coli*, ce mécanisme reste à être démontré en culture cellulaire eucaryote.

Dans une étude subséquente (Vassilaki et Mavromara, 2003), il a été démontré qu'une version de la protéine F fusionnée à la luciférase pouvait être exprimée dans des cellules de mammifère par un mécanisme d'initiation de traduction aux codons 85/87, indépendamment de l'expression de core. Ce mode de production, par la suite démontré par l'utilisation de la séquence core+1 de pleine longueur (Vassilaki et al., 2008a, 2008c, 2007), aboutit à la synthèse d'une protéine plus courte que celle produite par glissement ribosomal (d'où son appellation de core+1/S pour *short*). Même si core +1/S a été récemment décrite comme la forme prédominante de la protéine F (Vassilaki et al., 2007; Wolf et al., 2008), la présence d'autres isoformes ne peut être exclue puisque des anticorps anti-F dirigés contre des épitopes placés en amont des codons 85/87 ont été détectés chez certains patients infectés par le VHC. Baril et Brakier-Gingras ont soutenu l'hypothèse de l'initiation interne de traduction, en identifiant le codon non-AUG 26 (GUG ou GCG selon les variants viraux) comme site d'initiation (Baril and Brakier-Gingras, 2005). Ce mode de synthèse a été démontré dans un système de lysats de réticulocytes de lapin ainsi que dans des cellules HEK293FT où les 55 premiers codons de la protéine F étaient fusionnés à la luciférase. L'augmentation de la synthèse de luciférase après ajout des codons 85/87 à leur construction confirme l'hypothèse de la production d'une forme plus courte de F rapportée précédemment par l'équipe de Mavromara.

Ces données suggèrent que le cadre de lecture alternatif présent dans le gène de core permettrait la production de plusieurs ARFPs mais la présence simultanée ou différée de ces isoformes lors de l'infection naturelle reste à déterminer.

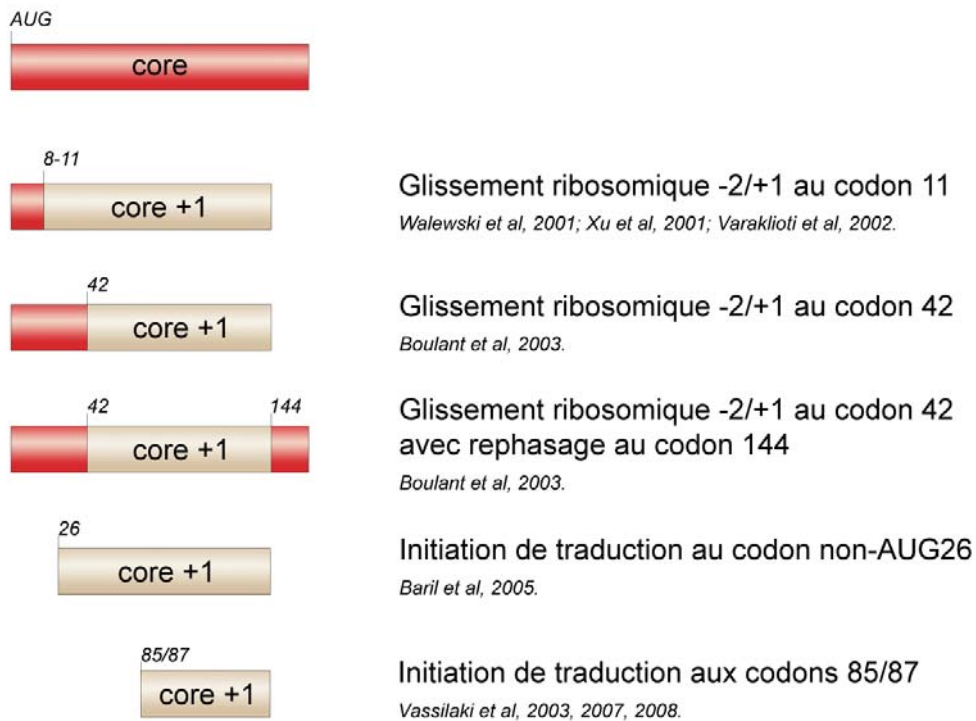


Figure 5. Modes d'expression de la protéine F.

Représentation schématique des modes de production des différentes formes de la protéine F. Le cadre de lecture de core est représenté en rouge, tandis celui de F (cadre +1) est représenté en beige. Les positions des codons promouvant le glissement ribosomal ou l'initiation de traduction sont indiquées au-dessus de chaque forme de la protéine F (Adapté de Vassilaki et Mavromara, *IUBMB life*, 2009).

1.4.4.3 Reconnaissance immunitaire

La reconnaissance de la protéine F par le système immunitaire de patients infectés par le VHC est une preuve évidente de sa production lors de l'infection naturelle. Plusieurs études ont démontré l'existence d'une réponse humorale anti-F chez 20 à 90% des patients infectés chroniquement par le VHC (Bain et al., 2004; Chuang et Allain, 2008; Cohen, 2007; Gao et al., 2010, 2008; Komurian-Pradel et al., 2004; Troesch et al., 2005; Varaklioti et al., 2002; Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). Cette réponse est aussi présente en moindre proportion, chez des patients en phase aiguë de l'infection (Morice et al., 2009). De plus, les titres d'anticorps anti-F sont significativement plus importants chez les patients chroniquement infectés que chez des patients ayant résolu l'infection (Chuang et Allain, 2008). Une réponse cellulaire est également développée contre la protéine F, avec la présence de lymphocytes T CD4+ F-spécifiques producteurs d'IFN γ et d'interleukine-10 (Bain et al., 2004), mais aussi d'une activité cytotoxique anti-F (Troesch et al., 2005). La réponse cellulaire F-spécifique se développe tard dans le cours de l'infection ou n'est que de très faible amplitude en phase aiguë, suggérant que sa présence n'est pas déterminante dans la clairance virale (Drouin et al., 2010). Par ailleurs, la réponse immunitaire contre la protéine F n'est pas altérée en cas de co-infection VHC/VIH-1 (Troesch et al., 2005).

Grâce à la forte conservation de la séquence de la protéine F, les anticorps et les cellules T anti-F présentent une grande réactivité croisée avec les antigènes issus des différents génotypes de VHC (Bain et al., 2004; Chuang et Allain, 2008; Gao et al., 2008; Komurian-Pradel et al., 2004; Troesch et al., 2005), caractéristique faisant de la protéine F un candidat intéressant pour l'élaboration d'un vaccin prophylactique ou thérapeutique contre l'hépatite C.

1.4.4.4 Propriétés biochimiques et fonctionnelles

1.4.4.4.1 Propriétés biochimiques

La protéine F est fortement basique, avec un point isoélectrique de 11.5 (Walewski et al., 2001). Elle comporte deux domaines hydrophobes majeurs (acides aminés 29 à 45 et 95 à

118) qui ont été mis en évidence par une analyse d'hydrophobicité de Kyte-Doolittle (Vassilaki et al., 2007). Les deux isoformes F et core +1/S sont des protéines relativement instables dont la demi-vie n'excède pas 10 minutes en raison de la régulation post-traductionnelle exercée par la protéine core, qui stimule leur dégradation *via* le protéasome (Roussel et al., 2003; Vassilaki et al., 2007; Wolf et al., 2008; Xu et al., 2003).

1.4.4.4.2 Localisation cellulaire

Comme pour le mode de production de la protéine F, sa localisation cellulaire reste controversée. La plupart des études s'accordent à dire que la protéine F est majoritairement localisée au niveau du RE et dans les régions périnucléaires (Ma et al., 2008; Roussel et al., 2003; Vassilaki et al., 2008c, 2007; Xu et al., 2003). Des analyses bio-informatiques ont notamment révélé la présence de deux signaux de rétention au RE dans les régions N- et C-terminales de la protéine (Vassilaki et al., 2007). Dans les cellules en division, la protéine F co-localise avec les microtubules et la tubuline du fuseau mitotique, suggérant un rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules ou de la mitose (Vassilaki et al., 2007). Certains groupes ont quant à eux démontré la présence de la protéine F au noyau (Ratinier et al., 2009; Tsao et al., 2006) ou encore aux mitochondries (Ratinier et al., 2009). Ces différences pourraient s'expliquer par le système expérimental utilisé. Notamment, Ratinier et al. ont démontré que la fusion de la GFP (*green fluorescent protein*) en N- ou C-terminal de la séquence de la protéine F pouvait modifier sa localisation (Ratinier et al., 2009). Les divergences de distribution cellulaire de la protéine F pourraient également être dues aux différentes fonctions qu'exercent les diverses ARFPs.

1.4.4.4.3 Fonctions biologiques

Plusieurs études indiquent que la protéine F n'est pas strictement requise pour la réplication virale. En effet, l'absence de la région structurale du génome du VHC dans les systèmes de réplicons n'a pas d'impact sur le processus de réplication (Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999). De plus, l'insertion de mutations non-sens dans le cadre +1 des génomes JFH1 ou H77/JFH1 (connus pour permettre une production virale hautement efficace en culture cellulaire) n'a pas d'effet notable sur la réplication du virus, sur la production de

protéines virales, ou même sur la relâche de particules infectieuses (Vassilaki et al., 2008a). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle *in vivo* de souris immunodéficientes uPA-SCID chez lesquelles la prolifération virale n'était pas altérée par l'absence de la protéine F (Vassilaki et al., 2008b). Cependant, en raison des limites que présentent les systèmes expérimentaux utilisés, un rôle de la protéine F dans la réplication au cours de l'infection naturelle ne peut être totalement exclu.

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la contribution de la protéine F aux fonctions précédemment attribuées à la protéine core. Les travaux de Basu et collègues (Basu et al., 2004) ont révélé que l'expression de la protéine F dans des cellules HepG2 pouvait entraîner une régulation négative de l'activité du promoteur de p21, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante associé à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Abbas et Dutta, 2009). Cette régulation pourrait être la conséquence de l'inhibition qu'exerce la protéine F sur la transcription et la traduction du gène suppresseur de tumeur p53, qui contrôle étroitement l'expression de p21 (Wu et al., 2007). Il a également été démontré que la protéine F était impliquée dans la régulation de l'expression de l'oncogène c-myc en augmentant sa trans-activation en interagissant avec MM-1, un inhibiteur de l'activité de c-myc (Ma et al., 2008; Wu et al., 2007). Ces données suggèrent que la protéine F est associée à la régulation de la croissance cellulaire, hypothèse également soulevée par les études démontrant la perturbation de l'organisation du cytosquelette de tubuline *via* l'interaction de la protéine F avec la préfoldine-2 (Tsao et al., 2006). Ainsi, la protéine F, tout comme la protéine core, pourrait avoir un rôle déterminant dans le développement de CHC. La prévalence élevée d'anticorps dirigés contre la protéine F chez des patients atteints de CHC vient appuyer l'idée de l'implication de la protéine dans l'établissement de la persistance virale (Dalagiorgou et al., 2011). De plus, la protéine F contribue à la production d'interleukine-6 (IL-6), d'IL-8 et de MCP-1, cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques retrouvées en grande quantité dans les stades avancés de dommages hépatiques (Fiorucci et al., 2007).

Enfin, l'utilisation de systèmes de levures double-hybrides (Guo et al., 2005) et des analyses par micropuces (Dou et al., 2006) ont permis de révéler 36 partenaires d'interaction de la protéine F ainsi que de nombreux gènes-cibles régulés positivement (125 gènes) ou négativement (143 gènes), qui sont impliqués dans le métabolisme lipidique ou carboné, la

transcription, la synthèse et le transport protéiques, la transduction de signaux, l'apoptose, l'oncogenèse ou encore l'immunorégulation.

1.5 Modèles d'études du VHC

La compréhension de la pathogenèse de l'hépatite C et la recherche de stratégies thérapeutiques ont été considérablement freinées par l'absence de systèmes de cultures cellulaires efficaces et d'un bon modèle animal.

1.5.1 Modèles *in vitro*

Plusieurs systèmes ont été développés pour étudier les différents aspects du cycle viral *in vitro* (Figure 6). La découverte du système de réplicon a permis une avancée importante dans le domaine, permettant pour la première fois l'étude de la réplication du VHC en culture cellulaire (Bartenschlager, 2005; Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999). Les réplicons sont des ARN bicistroniques dans lesquels la région structurale du génome viral est remplacée par la séquence d'un marqueur de sélection (gène de la néomycine phosphotransférase). Ces ARN se répliquent de façon efficace dans des lignées de cellules dérivées de CHC (Huh7), notamment en présence de mutations virales adaptatives (Lohmann et al., 2001).

Les mécanismes d'entrée du VHC ainsi que son tropisme ont quant à eux pu être étudiés grâce à l'élaboration d'un système de pseudoparticules (HCVpp) (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003). Dans ce système, les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (E1 et E2) sont exprimées à la surface de particules rétrovirales. Après l'entrée de ces dernières dans la cellule, le génome rétroviral est capable d'exprimer un gène rapporteur qui permet la mesure quantitative de l'entrée cellulaire. Enfin, la production de particules virales infectieuses *in vitro* n'a pu être possible qu'après l'identification d'un clone de VHC de génotype 2a provenant d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (désigné JFH-1 pour *Japanese fulminant hepatitis 1*) (Kato et al., 2003). Ce clone est capable de se répliquer efficacement dans divers types cellulaires sans mutation adaptative et peut produire des virions

capables d'infecter des cellules naïves ou un modèle animal (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). L'utilisation de lignées cellulaires dérivées des Huh7 et la création de clones JFH-1 chimériques a permis d'améliorer l'efficacité de ce système (nommé HCVcc pour *cell-culture grown hepatitis C virus*) (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006).

Même si ces découvertes rendent possible l'analyse *in vitro* de toutes les étapes du cycle viral, l'élaboration d'un système d'étude robuste applicable à tous les génotypes de VHC demeure un défi important.

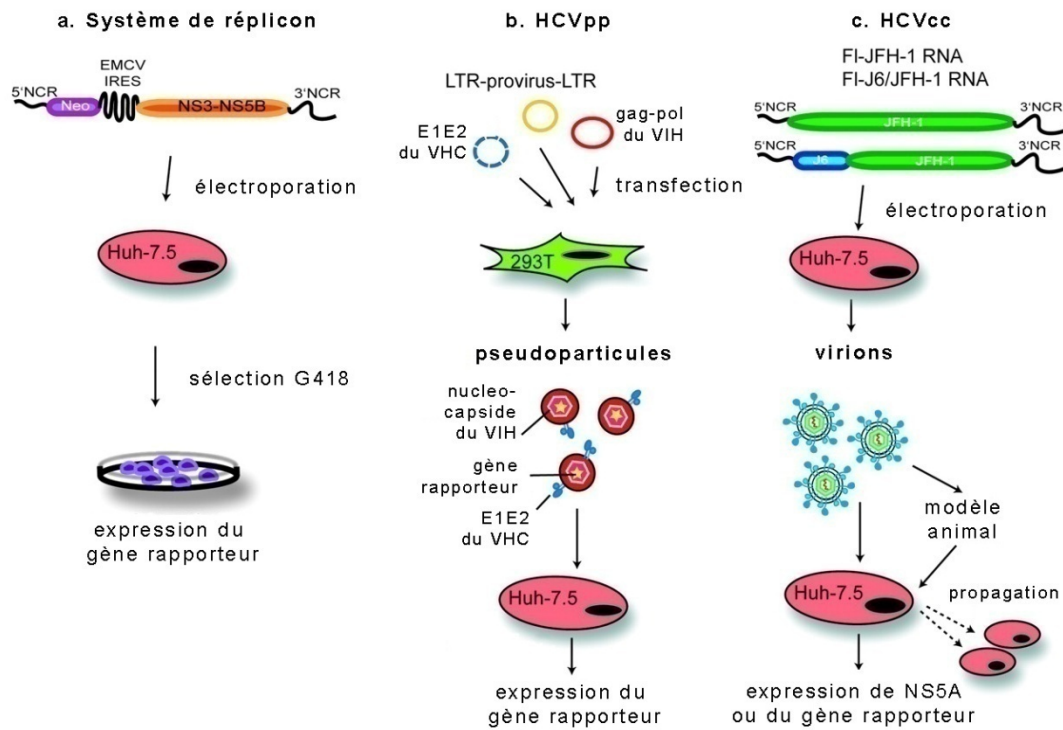


Figure 6. Modèles d'étude *in vitro* du VHC

(a) Le système de réplicon permet d'étudier la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire. La présence d'un marqueur de sélection (Neo^r) est utile pour sélectionner les colonies capables de répliquer efficacement le réplicon. (b) Des rétrovirus recombinants comportant les glycoprotéines d'enveloppe du VHC E1 et E2 sont produits dans des cellules 293T. L'entrée de ces pseudoparticules (HCVpp) dans des cellules permissives peut être mesurée quantitativement grâce à l'expression d'un gène rapporteur. (c) Le clone JFH1 ainsi que des chimères dérivées de ce génome peuvent se répliquer *in vitro* après électroporation dans des cellules permissives (Huh7.5) et produire des virions capables d'infecter des modèles animaux ou des cellules naïves. La production de particules virales infectieuses et leur propagation peuvent être mesurées par détection de l'expression d'un gène rapporteur, de la protéine NS5A, ou de l'ARN viral (Adapté de Tellinghuisen, *Journal of virology*, 2007).

1.5.2 Modèles *in vivo*

Le seul modèle animal susceptible à l'infection au VHC est le chimpanzé (Bukh et al., 2010). L'utilisation de ce modèle a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de l'hépatite C, comme la caractérisation de la réponse immunitaire induite par l'infection. Le chimpanzé constitue présentement le seul système expérimental disponible pour le développement de vaccins thérapeutiques ou prophylactiques (Houghton, 2011). On a ainsi pu démontrer qu'il est possible de contrôler la virémie et de limiter la progression de l'infection en phase chronique grâce à des vaccins induisant la production d'anticorps neutralisants ou une réponse immunitaire de type T (Houghton, 2011). Cependant, l'utilisation du chimpanzé est limitée par la disponibilité restreinte de ces animaux, leur coût élevé et surtout par des problèmes d'ordre éthique (Bukh, 2004). L'établissement d'un petit modèle animal permissif au VHC est donc crucial pour approfondir nos connaissances sur la pathogenèse, mais aussi pour accélérer la recherche de stratégies thérapeutiques et préventives.

Plusieurs approches ont été proposées pour élaborer un modèle murin adapté à l'étude du VHC (Figure 7). La première implique l'adaptation *in vitro* du virus pour qu'il acquière un tropisme murin. La deuxième stratégie repose sur l'humanisation génétique de la souris. Cette approche a pour but de rendre les cellules murines permissives à l'infection grâce à l'expression de facteurs humains impliqués dans le cycle viral. Les souris transgéniques Rosa26-Fluc expriment les récepteurs humains nécessaires à l'entrée du VHC à la surface de leurs hépatocytes (Dorner et al., 2011). Ce modèle peut s'avérer utile pour l'étude de l'entrée virale et de l'efficacité d'anticorps neutralisants visant à inhiber cette dernière. Cependant, il n'est pas adapté à la réplication du VHC, la virémie n'ayant pas été détectée chez ces souris (Bukh, 2012; Dorner et al., 2011). Enfin, la troisième alternative est l'humanisation de souris par xénogreffe. L'obtention de souris chimères peut s'effectuer par greffe d'hépatocytes humains sur des souris présentant de sérieux dommages hépatiques (dus à la surexpression de l'activateur plasminogène de type urokinase), et une immunodéficience sévère (afin d'éviter le rejet de greffe). Ces souris, nommées uPA-SCID, constituent un outil intéressant pour l'étude de l'infection, mais l'absence d'un système immunitaire fonctionnel restreint ses champs d'application (Bukh, 2012; Ploss et Rice, 2009). L'humanisation du système immunitaire de ces souris par greffe de cellules souches hématopoïétique a permis de pallier à ce problème

(Bukh, 2012; Legrand et al., 2009; Ploss et Rice, 2009). Ces souris AFC8-hu HSC/hep, au foie et système immunitaire humanisé, permettent l'étude de l'infection, de la réponse immunitaire et de la pathogenèse induites par le VHC comme la fibrose hépatique (Washburn et al., 2011). L'absence de cellules B complètement fonctionnelles et les faibles niveaux virémiques observés chez ces souris limitent toutefois leur utilisation (Bukh, 2012; Legrand et al., 2009).

La compréhension des mécanismes de pathogenèse induits par le VHC peut également s'effectuer à travers des modèles transgéniques d'animaux non susceptibles à l'infection exprimant une ou plusieurs protéines virales (Jiao et al., 2010). Ce type d'approche a permis notamment de montrer l'implication de la protéine core dans le développement de stéatose hépatique et de CHC (Lerat et al., 2002; Moriya et al., 1998, 1997).

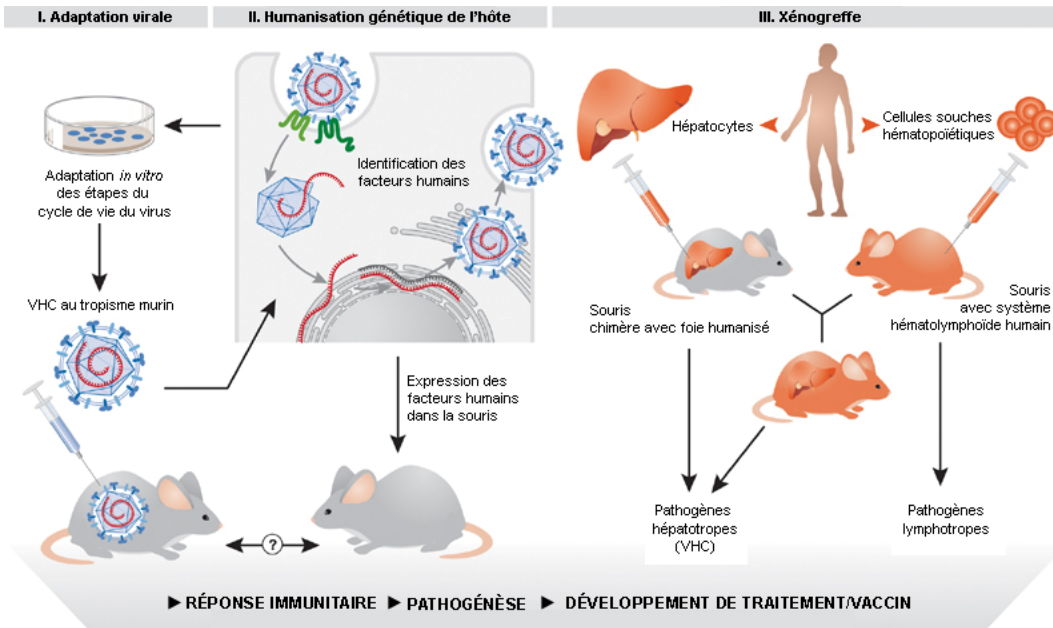


Figure 7. Stratégies pour générer des modèles de souris pour l'étude *in vivo* du VHC.

Représentation schématique des différentes stratégies mises au point pour établir des modèles de souris adaptés à l'étude *in vivo* du VHC. La première stratégie consiste à adapter *in vitro* le virus afin qu'il développe un tropisme murin. La deuxième stratégie repose la génération de souris transgéniques exprimant des facteurs et récepteurs humains pour permettre l'entrée du VHC dans les hépatocytes murins. Enfin, la troisième stratégie a pour but de rendre la souris permissive à l'infection au VHC en humanisant le foie et le système immunitaire par xénogreffe d'hépatocytes ou de cellules souches hématopoïétiques humains (Adapté de Ploss et Rice, *EMBO Reports*, 2009).

1.6 Le poisson zébré

Le poisson zébré (*Danio rerio*) est un modèle animal relativement récent qui s'est fait surtout connaître par son utilisation en embryologie et en développement. Il présente des avantages pratiques similaires à ceux des invertébrés, comme la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le ver (*Caenorhabditis elegans*), avec une manipulation génétique facile et rapide. Étant un vertébré, il partage cependant de nombreuses ressemblances anatomiques et moléculaires avec les mammifères. Même si la souris reste le modèle animal le plus utilisé en recherche en raison de la forte homologie génétique, anatomique et physiologique avec l'homme, le poisson zébré s'est avéré être un outil puissant dans de nombreux domaines d'études.

1.6.1 Génétique et transgénèse

Son génome ayant été entièrement séquencé, le poisson zébré s'avère être un outil génétique très intéressant notamment grâce à sa maniabilité génétique et à son développement très rapide à moindre coût (organisme complet fonctionnel à 5 jours post-fertilisation) (Lieschke et Currie, 2007). La génération de lignées de poissons zébrés transgéniques est rapide et efficace. En effet, l'utilisation de la recombinase du transposon *Tol2* a permis de faciliter et d'améliorer considérablement l'efficacité des techniques de transgénèse (Figure 8). Le transposon *Tol2*, identifié dans le génome du médaka (*Oryzias latipes*), est capable de se déplacer de façon autonome au sein du génome par des phénomènes d'excision et d'insertion catalysés par la recombinase (Koga et al., 1996, 1995). Des études ont démontré que le transposon *Tol2* était fonctionnel chez d'autres espèces, notamment chez le poisson zébré, et qu'il pouvait donc constituer un excellent outil de transgénèse (Kawakami 2007; Kawakami et al., 2000, 1998; Kawakami et Shima, 1999). Un plasmide donneur comportant la construction transgénique est co-injecté avec l'ARNm de la transposase *Tol2* dans des œufs de poissons zébrés fertilisés, encore au stade unicellulaire. Une fois traduite, la transposase catalyse l'excision de la construction grâce aux séquences de reconnaissance *Tol2* qui bordent cette dernière, permettant ainsi l'intégration du transgène au génome du poisson zébré. La transposase et son ARNm se dégradent au cours des stades précoces du développement

embryonnaire, et l'insertion de la construction demeure donc stable. L'ajout d'un marqueur fluorescent dans la construction facilite la sélection des poissons ayant intégré le transgène (poissons fondateurs F0), les larves étant transparentes durant les premiers jours de vie. Cette particularité constitue un des avantages majeurs de l'utilisation de ce modèle animal puisqu'elle permet la visualisation *in vivo* et en temps réel des mécanismes biologiques et cellulaires mis en évidence par des marqueurs fluorescents (Lieschke et Currie, 2007). Récemment, des lignées de poissons zébrés conservant leur transparence à l'âge adulte ont été générées, multipliant ainsi les champs d'application de technologie d'imagerie *in vivo* (White et al., 2008).

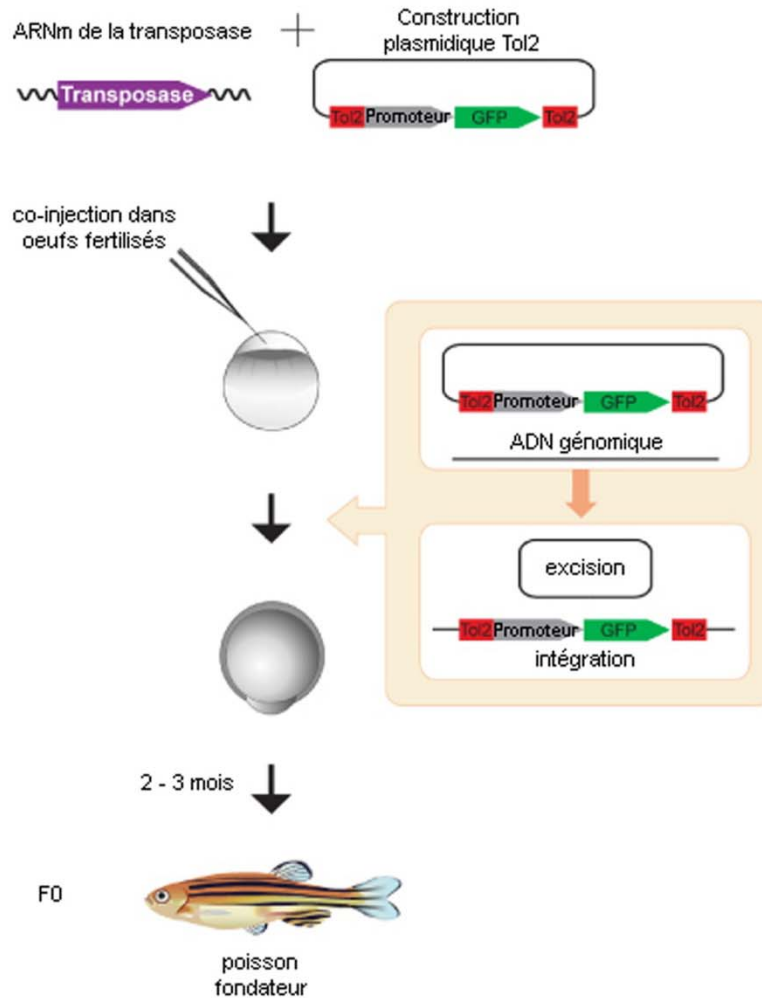


Figure 8. Transgène *Tol2*.

L'ARNm de la transposase *Tol2* (synthétisé *in vitro*) est co-injecté avec le plasmide donneur dans les œufs fertilisés de poisson zébré, au stade unicellulaire. La transposase médie l'excision de la construction bordée par les séquences *Tol2*, qui va alors s'intégrer dans le génome du poisson zébré. La présence de la GFP comme marqueur de transgène permet de sélectionner facilement les poissons ayant correctement intégré le transgène. Le poisson fondateur (F0) pourra ensuite être croisé avec un poisson de type sauvage pour obtenir la génération fille F1 (Adapté de Kawakami, *Genome Biology* 2007).

1.6.2 Le poisson zébré et les pathologies hépatiques

Avec la multiplication des domaines d'utilisation du poisson zébré, il a récemment été considéré comme un modèle utile dans l'étude des pathologies humaines, dont les pathologies du foie telles que le CHC, et la stéatose hépatique alcoolique et non-alcoolique (Amali et al., 2006; Cinaroglu et al., 2011; Lam et al., 2006; Liu et al., 2012; Passeri et al., 2009; Rekha et al., 2008). Même si l'architecture cellulaire et anatomique du foie du poisson zébré diffère quelque peu de celle des mammifères, les fonctions hépatiques et gastro-intestinales sont conservées (Chu et Sadler, 2009). Le poisson zébré s'est d'ailleurs révélé être un excellent outil pour la compréhension des mécanismes de développement du foie, révélant que l'hépatogenèse s'opère de manière similaire chez le poisson et la souris (Chu et Sadler, 2009). L'analyse comparative des caractéristiques histologiques et des profils d'expression génique dans les tumeurs hépatiques humaines et de poisson zébré a démontré la présence d'une très forte similarité entre les deux espèces (Lam et al., 2006), justifiant l'utilisation du poisson zébré comme modèle pour l'étude du CHC. En effet, il a été démontré que l'apparition de CHC peut être induite par la thioacétamide, et ce, de façon plus rapide chez des poissons transgéniques exprimant la protéine core du VHC spécifiquement au foie (Rekha et al., 2008). Dans des travaux récents, Liu et ses collaborateurs ont utilisé de telles lignées transgéniques pour décrire les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de fibrose et de cholangiocarcinome intrahépatique causé par les infections au VHC, mais également au VHB (Liu et al., 2012).

Le métabolisme lipidique du poisson zébré étant très similaire à celui des humains (Holtta-Vuori et al., 2010), ce petit organisme peut être utile pour étudier le développement de stéatose hépatique. Cette pathologie, caractérisée par une accumulation anormale de GL au foie, est couramment observée en cas de consommation excessive d'alcool (ALD, *alcoholic liver disease*) ou chez des patients atteints de maladies chroniques hépatiques (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*). Elle peut être induite chimiquement chez le poisson zébré par l'utilisation de la thioacétamide (Rekha et al., 2008). Il a également été démontré que le poisson zébré pouvait développer de la stéatose hépatique en réponse à l'exposition à l'alcool, ce qui constitue un bon modèle pour l'étude des ALD. De plus, le poisson zébré peut être employé pour analyser l'aspect génétique des NAFLD, grâce à l'identification et à l'analyse

de plusieurs mutants présentant de la stéatose hépatique (Hugo et al., 2012; Matthews et al., 2009; Sadler et al., 2005; Thakur et al., 2011; van der Velden et al., 2011). Notamment, des stratégies de génétique classique ont permis l'identification d'un gène nommé *foie gras* dont la mutation provoque le développement d'une stéatose sévère (Sadler et al., 2005).

Enfin, le poisson zébré peut être utilisé comme modèle de maladies infectieuses puisqu'il est susceptible à certaines infections virales et microbiennes (van der Sar et al., 2004) et qu'il possède un système immunitaire inné et adaptatif similaire à ceux des mammifères (Lieschke et al., 2001; Meeker et Trede, 2008). Cependant, la différence de température corporelle entre le poisson zébré et les mammifères (28°C contre 37°C) limite ce domaine d'utilisation.

L'emploi du poisson zébré pour l'étude des maladies humaines étant très récent, la disponibilité de certains outils, tels que les anticorps, est actuellement limitée. Mais le poisson zébré pourrait constituer un outil complémentaire à la souris et serait un bon modèle pour initier les études et effectuer le criblage à grande échelle de composés pharmaceutiques menant à l'identification de nouveaux agents thérapeutiques. Récemment, Ding et collègues ont montré que le poisson zébré pourrait constituer un modèle de réplication du VHC sur lequel pourrait être testé l'effet d'agents thérapeutiques sur la réplication virale. Deux vecteurs ont été générés : l'un comportant les gènes de l'ARN-polymérase ARN-dépendante NS5B et de la RFP (*red fluorescent protein*), et l'autre, le gène de core bordé par les régions 5' NTR et 3'NTR et le gène de la GFP. Ces réplicons ont été co-injectés dans des œufs fertilisés de poissons zébrés et leur amplification, mesurée par fluorescence, a pu être inhibée par l'ajout de ribavirine et d'oxymatine (deux composés anti-HCV) (Ding et al., 2011).

1.7 Hypothèse et objectifs

Les mécanismes par lesquels le VHC induit la pathogenèse hépatique ne sont pas bien compris. De nombreuses études ont démontré que la protéine core interfère avec un grand nombre de fonctions de la cellule-hôte, laissant suggérer que cette protéine occupe une place centrale dans la pathogenèse associée à l'infection au VHC. Or, on sait aujourd'hui que le

gène de core contient un cadre de lecture alternatif permettant la production de différentes formes d'ARFPs. La présence de la (ou des) protéine(s) F lors de l'étude des fonctions biologiques de core ne pouvant être exclue, il est possible que certains rôles attribués à core soient en fait le reflet de l'activité de la protéine F.

L'objectif de cette étude est donc de définir l'implication de la protéine F dans le développement de pathologie hépatique pour permettre une réévaluation des rôles respectifs des protéines core et F. Le poisson zébré s'étant révélé être un bon modèle d'étude des pathologies hépatiques, nous avons choisi de caractériser les fonctions biologiques de la protéine F à travers l'étude de lignées de poissons zébrés transgéniques exprimant spécifiquement au foie deux versions distinctes de protéine F, incluant AF11_{opti} (représentative du glissement ribosomal au codon 11) et AUG26_{opti} (représentative de l'initiation de traduction au codon 26). Les foies de poissons de génération F2 ont été analysés au niveau morphologique, histologique, microscopique et moléculaire afin de rechercher des signes de pathologie hépatique liés à l'expression de la protéine F.

Article

Contribution à l'article

Cet article a été écrit conjointement par moi et le Dr Hugo Soudeyns. La grande majorité des expériences et des analyses présentées ici ont été effectuées par mes soins au cours de ma maîtrise. Les poissons fondateurs, qui ont permis d'établir les lignées de poissons zébrés transgéniques, ont été initialement générés par Mathieu Quesnel-Vallières avec l'aide de Zen-Kuei Chang, Shin-Jie Huang, et Wangta Liu sous la supervision du Dr Jen-Leih Wu. Marion Depla, quant à elle, a effectué les expériences de microscopie électronique à transmission et m'a aidé à traiter ces données.

LIVER-SPECIFIC EXPRESSION OF HEPATITIS C VIRUS ALTERNATE READING FRAME PROTEIN LEADS TO HEPATIC STEATOSIS IN TWO LINES OF TRANSGENIC ZEBRAFISH.

Amélie Pagliuzza^{a,b}, Mathieu Quesnel-Vallières^{a,b}, Marion Depla^c, Zen-Kuei Chang^d, Shin-Jie Huang^d, Wangta Liu^d, Pierre Drapeau^e, Jen-Leih Wu^d, Hugo Soudeyns^{a,b,f}.

^aUnité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU mère-enfant Sainte-Justine, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. ^bDepartment of Microbiology & Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada. ^cUniversité François Rabelais, Inserm U966, 37032 Tours CEDEX, France. ^dInstitute of Zoology, Academia Sinica, Nankang, Taipei 115, Taiwan, R.O.C. ^eDepartment of Pathology & Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada. ^fDepartment of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) genome contain an alternate translational open reading frame in the core gene that allows the synthesis of so-called alternate reading frame protein (ARFP), the role of which remains poorly understood. To determine the biological functions of ARFP in hepatocytes and their influence on HCV-associated pathogenesis, we generated transgenic lines of zebrafish (*Danio rerio*) in which the liver fatty acid binding protein (L-FABP) promoter was used to direct liver-specific expression of various forms of ARFP, including AF11_{opti} (frameshift at codon 11, codon-optimized) and AUG26_{opti} (initiation at codon 26[+1], codon-optimized). The phenotype of F2 transgenic zebrafish was analyzed for morphological, histological and microscopic signs of liver-associated pathology. H&E staining revealed the presence of microvesicular steatosis in both AF11_{opti} and AUG26_{opti} lines. Accumulation of intracellular lipid droplets (LDs) was further confirmed using Oil Red O staining, transmission electron microscopy, and quantitative image analysis, which showed a significantly higher number of LDs and a larger cumulative LD area in transgenic liver than in wild-type. Analysis of liver sections stained with Masson's trichrome and real-time PCR measurement of TIMP-2 and MMP-2 expression didn't reveal any sign of hepatic fibrosis. Finally, expression of genes associated with oncogenesis (p53, c-myc) was not significantly enhanced in transgenic zebrafish liver. These results reveal the involvement of ARFP in the development of hepatic steatosis, but not fibrosis or oncogenesis, in transgenic zebrafish liver. The mechanisms that mediate ARFP-induced LD accumulation remain to be identified. These findings expand our understanding of the role of ARFP in the pathogenesis of hepatitis C, which could lead to the development of novel antiviral strategies.

Keywords: HCV; hepatitis C; ARFP; pathogenesis; transgenesis; zebrafish; hepatic steatosis.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is an important cause of chronic hepatitis (Wasley and Alter, 2000), with more than 170 million people infected worldwide (Alter and Seeff, 2000). There is currently no vaccine to prevent infection and available treatments have a limited effectiveness (Fried et al., 2002; Houghton and Abrignani, 2005; Manns et al., 2001). Research on HCV is limited in large part by the lack of suitable *in vivo* models of infection (Cohen, 2007; Varki, 2007).

HCV is a positive, single-stranded RNA virus, member of the *Flaviviridae* family (Choo et al., 1991). Its genome encodes a polyprotein that is cleaved by host and viral proteases to produce all structural (core, E1, E2) and non-structural (p7, NS2, NS3, NS4A-B, NS5A-B) viral gene products (Tellinghuisen et al., 2007). Besides its structural role, the nucleocapsid protein or core is thought to be responsible for the major pathogenic effects of HCV, including liver fibrosis, hepatic steatosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) (Ahmad et al., 2011; Marusawa et al., 1999; Roingard and Hourieux, 2008; Shrivastava et al., 1998).

In 2001, two groups reported the presence of an alternate open reading frame (ORF +1) within the core gene, leading to the synthesis of various forms of alternate reading frame proteins (ARFP), also termed F (*frameshift*) or Core +1 (Branch et al., 2005; Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). It was initially proposed that ARFP was produced by a ribosomal frameshift within an adenosine-rich region located at codons 8-11 of the core sequence (Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). Subsequent studies then suggested that ARFP was synthesized as a result of internal translation initiation at a non-AUG codon at position 26 or at AUG codons at positions 85 and/or 87 (Baril and Brakier-Gingras, 2005; Vassilaki et al., 2008, 2008c, 2007; Vassilaki and Mavromara, 2003). Recognition of ARFP by serum and T lymphocytes from HCV-infected subjects provides the evidence of its presence *in vivo* (Bain et al., 2004; Troesch et al., 2005; Varaklioti et al., 2002; Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001). However, its biochemical and functional properties remain poorly understood. ARFP is present in all HCV genotypes and its sequence is highly conserved (Walewski et al., 2001). Having a short half-life (Xu et al., 2003), this protein is not thought to be strictly required for viral replication (Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999; McMullan et al., 2007; Vassilaki et

al., 2008b). However, it has been reported to be involved in perturbation of the tubulin cytoskeleton (Tsao et al., 2006), modulation of cell cycle regulation, apoptosis (by interfering with p53 and c-myc expression) (Basu et al., 2004; Ma et al., 2008; Wu et al., 2007), and expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines (Fiorucci et al., 2007). Together with the high levels of anti-ARFP antibodies found in HCC patients (Dalagiorgou et al., 2011), these data suggest the implication of ARFP in HCV-associated pathogenesis. In addition, because the presence of ARFP cannot be excluded in studies of core biological functions, it is possible that some of the pathogenic roles attributed to core are in fact the result of ARFP activity.

The zebrafish (*Danio rerio*) has become a major model in developmental biology and neurobiology, in part because of the optical clarity of its embryos, its high fecundity, and the relative ease by which it can be genetically manipulated (Lieschke and Currie, 2007). Its use has now been extended to the study of a wide range of human diseases, and to the field of toxicology and drug discovery. Notably, zebrafish models have been used in research on hepatogenesis and liver disease, including hepatic steatosis and HCC (Berghmans et al., 2005; Chu and Sadler, 2009; Grabher and Look, 2006; Lam et al., 2006). Indeed, despite some anatomical differences between zebrafish liver and human liver, its development and functional properties are highly conserved, including the gene expression profiles that are observed in hepatic tumours (Lam et al., 2006). In 2003, the team of Jen-Leih Wu used the liver fatty acid binding protein (L-FABP) promoter to drive high levels of transgene expression in zebrafish liver (Her et al., 2003, 2003b) and applied this model to the study of the functional properties of viral proteins from HCV and hepatitis B virus (HBV) (Liu et al., 2012; Rekha et al., 2008). Here, we generated a pair of transgenic zebrafish lines in which the expression of two distinct forms of ARFP was specifically targeted to the liver. Our results reveal the involvement of ARFP in the development of hepatic steatosis, but not fibrosis or oncogenesis.

Materials and methods

Sequences and constructs. *Tol2*-mediated transgenesis was based on the use of two vectors: (i) the liver-specific activator plasmid pT2-LF2.8-tTA2 expressing the tTA2 transactivator under the control of the liver fatty acid binding protein (L-FABP) promoter; (ii) the Tet-responsive plasmids pT2-BI-AF11_{opti}-AcGFP or pT2-BI-AUG26_{opti}-AcGFP that contain a bidirectional tTA2-responsive CMV promoter driving the expression of ARFP and *Aequorea coerulea* green fluorescent protein (AcGFP) as marker of transgenesis. *Tol2* sequences flanking both constructs allow transgene integration in presence of *Tol2* transposase (Figure 1). Sequences encoding two distinct forms of ARFP, namely AF11 (Xu et al., 2001) and AUG26 (Baril and Brakier-Gingras, 2005), were isolated from a subject infected with HCV genotype 1a (Troesch et al., 2005). In the case of AF11, two cytosine residues were introduced at codon 12 in the core sequence to create a +1 frameshift (Troesch et al., 2005). In the case of AUG26, the first 25 codons of the core protein gene were deleted and the GTG codon at position 26 (+1) was replaced by an ATG to enhance translation (Figure 2). Both genes contain ATG codons at position 85 and 87 that could initiate the production of the «short» ARFP (Core+1/S). AF11 and AUG26 sequences were then optimized (Figure 3), using the OptimumGene algorithm (GenScript, Piscataway, NJ, USA) to enhance protein expression in zebrafish (Genscript USA Inc, 2012). Optimized genes AF11_{opti} and AUG26_{opti} were then cloned between the BmtI and ClaI sites of pT2-TRE-AcGFP.

Generation of transgenic zebrafish lines. *Tol2* transposase mRNA was synthesized from the pCS-TP vector (kindly provided by Koichi Kawakami, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Japan) using the mMMESSAGE mMACHINE method (Ambion, Austin, TX, USA), as previously described (Kawakami et al., 2004). After purification (MEGA Clear, Ambion), transposase mRNA was co-injected with pT2-LF2.8-tTA2 and either pT2-BI-AF11_{opti}-AcGFP or pT2-BI-AUG26_{opti}-AcGFP into one-cell stage fertilized zebrafish eggs. After 5-7 days of incubation at 28°C, embryos were anesthetised with 2-phenoxyethanol (0.5 µl/ml) and screened under a fluorescent microscope to select for liver-specific green fluorescent protein (GFP) expression. Upon reaching maturity, F0 founder fish were crossed

with wild-type (WT) to generate F1 fish. F2 fish were obtained by breeding F1 with WT. Adult fish were maintained at 28°C with 14 hours light/10 hours darkness cycles. WT and transgenic zebrafish were euthanized with 2-phenoxyethanol (1:500) prior to histological and microscopic examination. All experiments were approved by the local Animal Care Committee of CHU Sainte-Justine Research Center, in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care (CCAC).

Analysis of transgene integration. For both transgenic lines, genomic DNA was extracted from caudal fin clips using proteinase K (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. 1 µl of each sample was amplified in a 50 µl PCR reaction comprising an initial denaturing step at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 1 minute at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 1 minute at 72°C. After final extension at 72°C for 5 minutes, PCR products were analyzed on 1% agarose gels. See Table 1 for primer sequences.

Analysis of ARFP expression. RNA was extracted from control and transgenic liver using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and was treated with DNaseI (Fermentas). 100 ng of DNA-free RNA were used in a one-step RT-PCR reaction (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Samples were then analyzed on 1% agarose gels. See Table 1 for primer sequences.

Liver histology. Whole adult zebrafish (6 months old) were sacrificed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sliced into 5 µm sections. Deparaffinized and rehydrated tissue sections were then stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Masson's trichrome according to standard procedures. For Oil Red O (ORO) staining, livers from WT and transgenic adult fish were fixed in 4% paraformaldehyde O/N at 4°C and rinsed 5 times with phosphate buffered saline (PBS) for 30 minutes at 4°C. Samples were incubated sequentially in 15%, 20%, and 30% sucrose, followed by 30% sucrose:OCT medium (1:1) under gentle agitation. Tissues were then embedded in Tissue-Tek OCT

medium (Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA), and stored at -80°C. Eight to 10 μm cryostat sections were dried at room temperature for 1 hour, and stored at -20°C. Tissue sections were then rehydrated in PBS, rinsed briefly in 60% isopropanol, and then stained in ORO working solution for 15 minutes. After several dips in 60% isopropanol to remove excess of ORO solution, slides were rinsed in deionized water, stained for 1 second in Harris' hematoxylin, rinsed in tap water, and mounted using 78% glycerol/PBS.

Lipid droplets quantification by electron microscopy. For transmission electron microscopy (TEM), liver from WT and transgenic zebrafish were prepared as previously described (Depla et al., 2012). Lipid droplets (LDs) analysis was performed using a TEM-based technique recently developed by Hourieux et al. (Depla et al., 2012, 2010; Hourieux et al., 2007) at the RIO Electron Microscopy Facility of François Rabelais University (Tours, France). Briefly, 10 consecutive EM standard sections were examined for each sample to evaluate the number and diameter of LDs. Diameter (μm) of each LD was then converted into area (μm^2) to obtain cumulative LDs area (μm^2) per section.

Quantitative real-time PCR. RNA was prepared as described above from 3, 6 and 12 month-old fish (n=3 for WT and n=8 for AF11_{opti} in each age group). cDNA was synthesized from 0.7 μg of DNA-free RNA using Transcriptor Universal cDNA Master (Roche, Laval, Quebec, Canada). All samples were diluted 1:6 and added to the PCR mix that was previously aliquoted in 96-well plates, in accordance with the LightCycler 480 SYBR Green I Master protocol (Roche). Real-time PCR was performed in a LightCycler 480 Instrument (Roche). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), p53, and c-myc was analyzed in triplicate samples. 28S rRNA was used as a standard. Melting curve genotyping was performed to verify the specificity of PCR amplification. See Table 1 for primer sequences.

Results

Expression of ARFP in transgenic zebrafish liver. To generate transgenic zebrafish lines expressing two distinct forms of ARFP specifically in the liver, pT2-LF2.8-tTA2 and either pT2-BI-AF11_{opti}-AcGFP or pT2-BI-AUG26_{opti}-AcGFP were co-injected with *Tol2* transposase mRNA into fertilized zebrafish eggs at the one-cell stage. Embryos expressing GFP specifically in the liver were selected (F0 founders) and were then bred to WT to generate F1 lines. F2 fish were obtained by breeding F1 families with WT. The integration of both AF11_{opti} and AUG26_{opti} constructs in zebrafish genome was verified by PCR in F1 (data not shown) and F2 fish (Figure 4A). In both cases, ARFP coding sequences were amplified, confirming the presence of the transgene in the two transgenic lines. Stable expression of ARFP mRNA was then confirmed by RT-PCR performed on total mRNA extracted from the liver (Figure 4B). These results revealed that both AF11_{opti} and AUG26_{opti} transgenic lines were able to express ARFP mRNA in the liver, even though the presence of ARFP per se could not be confirmed by western blot or immunostaining because of the lack of a suitable anti-ARFP antibody.

H&E staining and microscopic examination of transgenic zebrafish livers. Examination of sections of adult zebrafish livers (F2 transgenic lines or WT) revealed striking morphological alterations in transgenic fish as compared to WT. Hepatocytes from AF11_{opti} and AUG26_{opti} fish exhibited signs of cytoplasmic vacuolation consistent with the accumulation of LDs and the presence of microvesicular steatosis (Figure 5). Interestingly, both AF11_{opti} and AUG26_{opti} transgenic zebrafish livers exhibited a similar phenotype.

Accumulation of lipid droplets. To further characterize the phenotype of our zebrafish transgenic lines, staining for LDs was performed on frozen liver sections using ORO (Figure 6A). Consistent with our previous results, microscopic analysis revealed larger amounts of ORO staining in AF11_{opti} and AUG26_{opti} lines as compared to WT controls, indicative of a significant accumulation of LDs into the cytoplasm of hepatocytes. Liver sections were also analyzed by TEM in order to provide a quantitative assessment of hepatic

steatosis (Depla et al., 2012, 2010; Hourieux et al., 2007). TEM micrographs (Figure 6B) revealed salient differences between transgenic lines and WT controls, both in term of number and size of LDs. This observation was confirmed by quantitative image analysis, which revealed significantly higher numbers of LDs in AF11_{opti} and AUG26_{opti} liver than in controls ($p < 0.0001$; ANOVA, Bonferroni post-test) (Figure 6C, left panel). Statistically significant differences were also observed when comparing the number of LDs between the two transgenic lines ($p < 0.0001$; ANOVA, Bonferroni post-test), with AF11_{opti} exhibiting accumulation of a greater number of LDs than AUG26_{opti}. Furthermore, the cumulative LD area per section, obtained following the measurement of LD diameter, was significantly higher in transgenic lines ($p < 0.0001$; ANOVA, Bonferroni post-test) (Figure 6C, right panel). AF11_{opti} tended to exhibit larger LD area per section than AUG26_{opti}, but that difference did not reach statistical significance. Taken together, these results indicate that ARFP expression is associated with the development of a phenotype compatible with microvesicular steatosis in transgenic zebrafish liver.

Liver fibrosis and oncogenesis. Liver fibrosis is characterized by an accumulation of extracellular matrix (ECM) that occurs as a result of hepatic injury. This pathology is frequently observed in patients with acute or chronic liver disease and can be accelerated in the presence of hepatic steatosis (Adinolfi et al., 2001; Hourigan et al., 1999; Westin et al., 2002). In order to determine whether ARFP expression contributes to fibrogenesis, Masson's trichrome staining was performed on paraffin sections from WT and transgenic zebrafish lines (Figure 7A). Histological analysis revealed no differences between transgenic fish and controls, with no visible signs of collagen accumulation. To confirm the absence of fibrosis, the expression of two fibrosis marker genes (TIMP-2 and MMP-2) was examined in liver samples from 3, 6 and 12 month-old zebrafish (WT n=3; AF11_{opti} n=8 in each age group). Expression of MMPs and TIMPs is increased during liver fibrosis, resulting in accumulation of ECM components (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Therefore, quantitative real-time PCR was performed on WT and AF11_{opti} liver cDNA to investigate whether expression levels of TIMP-2 (Figure 7B) and MMP-2 (Figure 7C) mRNA were modified in the presence of ARFP. Results revealed no significant changes in levels of expression of both marker genes in

6 and 12 month-old AF11_{opti} fish as compared to WT. However, significantly reduced expression levels of TIMP-2 and MMP-2 as compared to WT were observed in 3 month-old transgenic zebrafish ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$, respectively; unpaired t test). None of these results were representative of a fibrotic profile. Consistent with previous histological observations, ARFP expression was not associated with the development of liver fibrosis in the AF11_{opti} transgenic line.

It was suggested that steatosis could contribute to liver carcinogenesis in chronically HCV-infected individuals (Ohata et al., 2003; Roingeard and Hourieux, 2008). Moreover, some studies have suggested a potential role for ARFP in the development of hepatocellular carcinoma *in vitro*, by down-regulation of the p53 tumor suppressor and up-regulation of c-myc (Ma et al., 2008; Wu et al., 2007). In addition, Rekha et al. (2008) have shown similar results in transgenic zebrafish lines expressing HCV core protein in the liver. Hence, to determine whether p53 and c-myc expression was modulated by ARFP, quantitative real-time PCR was performed on cDNA prepared from 3, 6 and 12 month-old zebrafish liver (WT n=3; AF11_{opti} n=8 in each age group). Expression levels of both p53 (Figure 8A) and c-myc (Figure 8B) were not significantly different in transgenic zebrafish as compared to controls. This was observed in both young and older fish. These results are consistent with our histological analysis, which did not reveal the presence of tumor masses compatible with HCC in transgenic zebrafish and WT controls alike.

Discussion

In the present study, *Tol2*-mediated transgenesis was used to generate two transgenic zebrafish lines that expressed two distinct forms of HCV ARFP (*i.e.* AF11_{opti} and AUG26_{opti}) specifically in the liver. To ensure high-level of ARFP expression in zebrafish liver, the nucleotide sequences of those genes were codon-optimized. Because of the absence of a functional anti-ARFP antibody, the presence of ARFP protein itself was not shown; however, integration of the transgenes into the zebrafish genome and expression of both AF11_{opti} and AUG26_{opti} mRNAs were confirmed. Histological analysis of livers sections from F2 transgenic lines revealed vacuolated cytoplasm consistent with an abnormal lipid

accumulation into hepatocytes. These morphological alterations are compatible with the accumulation of LDs and with the presence of microvesicular steatosis, a liver pathology that can be observed in up to 50% of patients with chronic HCV infection (Roingear and Hourieux, 2008). Because previous studies demonstrated that transgenesis mediated by pT2-LF-tTA and pT2-GFP-BI (that directs liver-specific expression of GFP) did not induce hepatic injury or pathology (Liu et al., 2012), it is most likely that ARFP expression was responsible for the liver condition observed in both transgenic lines. This phenotype was confirmed using ORO staining, TEM, and quantitative image analysis, a technique which provides a precise measurement of the cumulative area covered by LDs. This experimental approach revealed the presence of a significant accumulation of LDs in hepatocytes from transgenic zebrafish lines. The fact that liver from AUG26_{opti} fish exhibited LD accumulation suggests that the first 26 amino-acid residues of ARFP are dispensable for this phenotype. However, quantitative image analysis revealed the presence of a slight but statistically significant difference between the two transgenic lines, as AF11_{opti} liver exhibited more LDs and larger cumulative area covered by LDs than AUG26_{opti} liver. These observations suggested that the N-terminal portion of the AF11_{opti} gene product, which is identical to the first 11 amino-acids of the HCV core protein, could in fact enhance the prosteatotic effects induced by the remainder portion of ARFP (*i.e.* downstream of codon 26). In addition, because of the presence of internal AUG codons at positions 85 and 87 in both constructs, the expression of the «short» ARFP (Core +1/S) in transgenic liver and its involvement in pathogenesis cannot be excluded.

ARFP sequences used in our study were derived from HCV genotype 1a, and our results show that both are associated with the induction of a phenotype compatible with microvesicular hepatic steatosis in transgenic zebrafish lines. However, several clinical studies have suggested that hepatic steatosis is more severe in patients infected with HCV genotype 3 than other genotypes (Adinolfi et al., 2001; Rubbia-Brandt et al., 2000). Furthermore, Piodi et al. (2008) demonstrated that expression of the core protein from genotype 3 induced the accumulation of larger LDs than the genotype 1 core protein. Thus, it would be interesting to generate transgenic zebrafish lines expressing ARFP from genotype 3 in order to investigate whether the severity of steatosis is increased or not. The possible correlation between the severity of steatosis and core protein sequences was recently examined by Depla et al. (2012)

in patients with chronic HCV infection, but no association was found. However, development of severe steatosis could conceivably be linked to ARFP amino acid sequences, which are less conserved than those encoding the core protein (Walewski et al., 2002). Taken together, these data support the implication of ARFP in the regulation of liver lipid metabolism, something that was hypothesized in previous reports. Indeed, using the yeast two-hybrid system, Huang et al. (2005) identified interacting partners of ARFP that were related to lipid metabolism. Furthermore, bioinformatics analysis revealed the presence of a binding site for low density lipoprotein (LDL) receptor class B within ARFP sequence (Shesheer Kumar et al., 2008), and a region (amino acids 72-115) highly similar to the transmembrane domain of ATP-binding cassette transporter ABCA1, a protein that plays a key role in the transport of cellular cholesterol and phospholipids towards lipid-poor high-density lipoprotein (HDL) (Vassilaki et al., 2007).

It is known that HCV replication is tightly linked to lipid metabolism, the presence of LDs being required for efficient viral assembly and production of infectious viral particles (Bartenschlager et al., 2011). Therefore, the involvement of ARFP in the disruption of LD trafficking would be compatible with its putative importance in propagation and survival of the virus, as suggested by its high degree of sequence conservation among all HCV genotypes (Walewski et al., 2001) and by its reported association with prefoldin-2 leading to the disruption of the tubulin cytoskeleton (Tsao et al., 2006). Moreover, as the development of steatosis was observed in HCV core transgenic mice (Lerat et al., 2002; Moriya et al., 1997), a re-evaluation of the respective contribution of core protein and ARFP in the pathogenesis of this disease should be considered.

A recent study has demonstrated that core gains access to LDs by interacting with diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1), a key enzyme for the synthesis of triglycerides (TG) (Herker et al., 2010). This localization enables core to stabilize LDs by interfering with TG turnover, ensuring efficient viral assembly. Thus, it would be of interest to investigate whether ARFP is also capable of co-localizing with LDs and playing a role in the impairment of TG metabolism. However, such studies are presently limited by the unavailability of functional anti-ARFP monoclonal antibodies and by the fact that tagging the N-terminal or C-terminal of ARFP can bias its subcellular localization (Ratinier et al., 2009). Other possible

mechanisms of core-induced lipid accumulation have been described. Core mediates the inhibition of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity (Perlemuter et al., 2002), a major protein in lipoprotein assembly, and also interferes with the expression of genes implicated in fatty acids biosynthesis, such as SREBP or PPAR α/γ (Kim et al., 2007). However, it remains unclear whether those molecular changes are directly or indirectly linked to core protein activity. Thus, the potential involvement of ARFP in these mechanisms could provide an explanation for the fact that no direct interaction between core protein and SREBP or PPAR α/γ has been demonstrated to date.

Other studies have shown that core protein contributes indirectly to the development of steatosis by causing oxidative stress *via* inhibition of β -oxidation and induction of oxidative damage to the mitochondria (Okuda et al., 2002). Since ARFP was reported to localize to the mitochondria (Ratinier et al., 2009), accumulation of lipids could conceivably be induced by the proposed pro-oxidant role of ARFP. Finally, histological examination of the liver of AF11_{opti} and AUG26_{opti} transgenic zebrafish lines revealed a picture consistent with microvesicular steatosis, to which mitochondrial β -oxidation is a well-described contributor (Natarajan et al., 2006).

Liver fibrosis is a frequent finding in HCV-infected patients (Adinolfi et al., 2001; Hourigan et al., 1999; Westin et al., 2002). According to our histological analysis using Masson's trichrome staining and measurement of the expression levels of fibrosis marker genes TIMP-2 and MMP-2, signs of this pathology were not present in either of our two ARFP-transgenic zebrafish lines. Thus, our results are not in support of a role of ARFP in the development of liver fibrosis, though we cannot exclude its potential involvement during natural HCV infection.

Previous studies have also suggested a possible role of ARFP in oncogenesis and in the development of HCC. Mutations in frameshift signal sequences required for ARFP expression were observed more frequently in HCV-infected HCC sufferers (Yeh et al., 2000). In addition, Dalagiorgou et al. (2011) demonstrated the presence of higher levels of HCV Core+1 antibodies in HCC patients compared to chronic HCV carriers, suggestive of a link between the presence, expression and/or levels of ARFP and HCC. In HepG2 human hepatoma cells, ARFP was able to down-regulate p53 and up-regulate c-myc (Wu et al.,

2007), and yeast two-hybrid screens revealed a physical interaction between ARFP and MM-1, an inhibitor of c-myc trans-activation, leading to an enhancement in c-myc activity (Ma et al., 2008). Furthermore, liver steatosis can be a contributing factor to the development of liver carcinogenesis (Ohata et al., 2003; Roingeard and Hourieux, 2008). Hence, we examined whether similar findings could be observed in our transgenic zebrafish lines. Surprisingly, our results revealed no changes in c-myc or p53 mRNA expression. The discrepancies between our data and previous reports could be explained by the experimental systems that were used, *i.e. in vivo* studies *versus* hepatoma cell lines in which gene expression profiles could differ from those observed in primary hepatocytes.

In summary, the present study is the first to relate the expression of HCV ARFP and liver pathogenesis by using an *in vivo* model. The involvement of ARFP in the development of hepatic steatosis, a role that was so far primarily attributed to the core protein, was demonstrated using three different analytical approaches. Although the precise cellular and molecular mechanisms that underpin the ARFP-associated accumulation of LDs remain to be characterized, prime candidates include modulation of lipid metabolism, interference with normal intracellular trafficking of LDs, and impairment of mitochondrial function. In addition, the experimental evidence presented herein could lead to a re-evaluation of the respective biological properties of core protein and ARFP and to a reassessment of their possible functional interplay (Wolf et al., 2008). In contrast, ARFP expression did not induce fibrosis or the development of HCC in our model. However, the potential involvement of ARFP in carcinogenesis and/or in the generation of hepatic injury in the context of natural HCV infection cannot be excluded. A better understanding of the roles of HCV gene products is crucial for the development of novel antiviral strategies. Together with other recent reports, the present study argues in favour of the establishment and acceptance of transgenic zebrafish as a valuable *in vivo* model in the fields of virology and lipid research.

Table I. Primer sequences used in PCR, RT-PCR and quantitative real-time PCR.

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AF11opti	ATGAGCACCAACCCCAAGCCT	CCAAAAGCCGGAGGCCATTCT
AUG26opti	CTGTGAGAAGCCTGGTGGAGT	TCAAGCTGTGCGCCAAAAGCC
TIMP-2	AGGCGGAGGCCAACGGTAAGAT	TGGGAAGGTTGCACAGCGTGTG
MMP-2	TACGGTAATGCCGAGGGCGAGT	AGTCATGGGGACAGAAGCCGT
p53	GGGAGCAAAAAGGCCAAGGGCT	GCATCTGAGGCAGGCACCAT
c-myc	TGGTTCGGATGTGCGCTCGAAT	AGCCCAAAGCGGCGGTTATTCT
28S	CGAGATTCCCACTGTCCCTA	GGGGCCTCCCACTTATTCTA

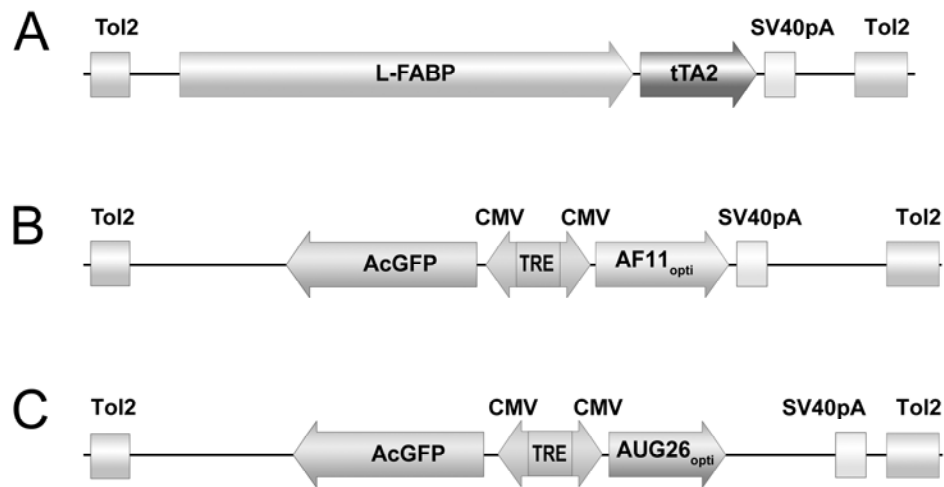


Figure 1. Transgenesis constructs.

(A) Liver-specific activator plasmid pT2-LF2.8-tTA2 expressing the tTA2 transactivator under the control of the liver fatty acid binding protein (L-FABP) promoter. (B) and (C) Tet-responsive plasmid pT2-BI-AF11opti-AcGFP and pT2-BI-AUG26opti-AcGFP containing a bidirectional tTA2-responsive CMV promoter driving the expression of ARFP and GFP as marker of transgenesis. *Tol2* sequences flanking both constructs allow transgene integration.

A

```
AF11opti ATGAGCACCAACCCCAAGCCTCAGAGGAAAACCTCCAATGTGACACCTACCGTGGCTCACAGAACA
AF11 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAGAGGAAGACCCCAAAGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACG

AF11opti AGCTCTTCCCGCGTGGCCGTGAGATCACTGGTGGAGTTCACCTGTTGCAGAGCCGGTGCACTGGAC
AF11 TCAAGTTCCTCCGGGTGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGAGGGGCCCTAGAT

AF11opti TGGGTGTGTGCCAGAAAGGGGAGGCTGCCTAGTGGTTCGCAACCTGGAGGTGGATGTGTCCCTGTCA
AF11 TGGGTGTGCGCGCGACGAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCC

AF11opti CTGAGACATGTGGTCCAAGGGCAGGACCAGGCTGTCTCCTGGCACTCTGGGTCTTCCATGGCT
AF11 CTAAGGCACGTCGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGTACCTTGGCCCTCTATGGCA

AF11opti ATGCGCGCTGCCGACGGAAGAGATGGCAGCTGCCTGCCAGTGCACTGGGTCTGGTGGGAGCTCCT
AF11 ATGAGGGCTGCGGATGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCGTGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCA

AF11opti CAGACACCTGGTGTGGGAAGGGCAATCTGGGTGCGCTCAAGTATTCCATCTCGCGCAGTAGTCCC
AF11 CAGACCCCGCGTAGGTGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTCACGTGCGGCTTCGCCG

AF11opti ACTAGCTGGGGAACATACAGAAGCTCTGCTCCTCCAATGGAGGCACTGCCAGGACCATGGAGAATG
AF11 ACCTCATGGGTACATACCGCTCGTGGCGCCCCCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATG

AF11opti GCCTCCGGCTTTTGGAGGACAGCATGA
AF11 GCGTCCGGGTTCTGGAGGACGGCGTGA
```

B

```
AUG26opti ATGGCTGTGAGAAGCCTGGTGGAGTTCACATGTTGCAGGGCCGGTGCACTGGACTGGGCTTGTGCA
AUG26 ATGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGCGTGC

AUG26opti AGAAGGGGTAGGCTGCCTTCTGGTAGAAACCTGGAGGTGGATGTCAGTCTGAGCCTGAGGCACGTG
AUG26 CGACGAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCCCTAAGGCACGTC

AUG26opti GGTCTTAGGGCAGGACCAGGCTGTGACCCGGCACCTGGGTCCCAGTATGGCAATGAGAGCTGCC
AUG26 GGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCG

AUG26opti GACGGAAGGGATGGCTCCTGCCTGCCTGTGGCTCTGGGTCTGGTGGGAGCACACAGACTCCTGGT
AUG26 GATGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCGTGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCACAGACCCCGGC

AUG26opti GTGGGACGCGCTATCTGGGTGAGAAGCTCTATTCTTCTAGAGCAGCTTCTCCAACATCTGGGGA
AUG26 GTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTCACGTGCGGCTTCGCGACCTCATGGGTT

AUG26opti ACCTACAGATCCTCAGCACCTCCAATGGAGGCACTGCCAGGACCTTGGAGGATGGCAAGCGGCTTT
AUG26 ACATACCGCTCGTGGCGCCCCCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTTC

AUG26opti TGGCGCACAGCTTGA
AUG26 TGGAGGACGGCGTGA
```

Figure 3. Codon optimization of ARFP sequences

DNA alignment of AF11 (A) and AUG26 (B) with optimized sequences (AF11_{opti} and AUG26_{opti}, respectively). Codons that have been modified are indicated in red.



Figure 4. Transgene integration and ARFP expression.

(A) PCR performed on genomic DNA extracted from caudal fin show transgene integration in both AF11_{opti} and AUG26_{opti} transgenic lines. WT gDNA was used as negative control. (B) RT-PCR performed on DNase-treated RNA extracted from the liver confirms ARFP expression in AF11_{opti} and AUG26_{opti} transgenic lines. WT RNA was used as negative control.

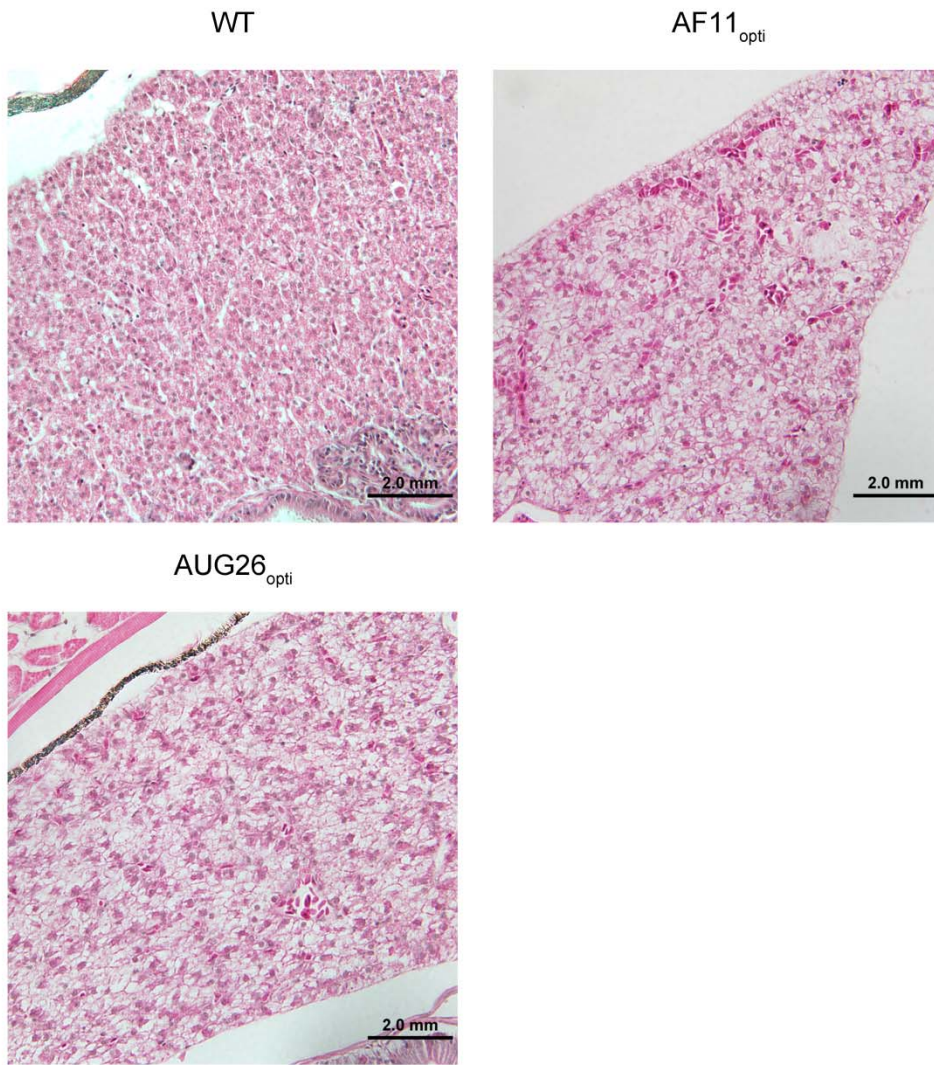


Figure 5. Histological analysis of the liver.

Hematoxylin-eosin (H&E) staining performed on 5 μ m paraffin sections from WT and F2 transgenic fish. AF11_{opti} and AUG26_{opti} livers show vacuolated cytoplasm as compared to WT.

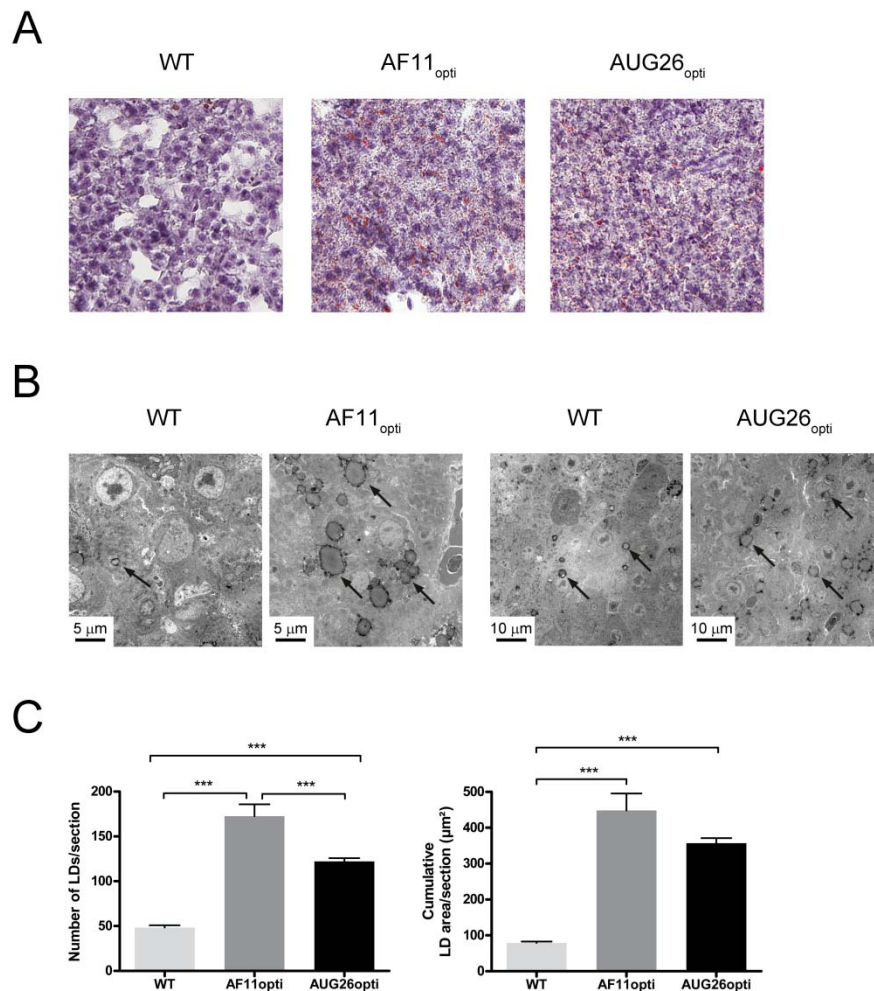


Figure 6. Accumulation of LDs in hepatocytes.

(A) ORO staining. ORO staining performed on 10 μm frozen sections of liver from WT and F2 transgenic fish display an accumulation of LDs (in red) in both transgenic livers. **(B) Transmission electron microscopy (TEM) analysis.** TEM micrographs confirmed the accumulation of LDs in transgenic livers (LDs are indicated by black arrows). **(C) LD quantification.** Quantitative image analysis of TEM micrographs from WT and transgenic livers shows the number of LDs per section (mean on 10 consecutive EM standard sections ± s.e.m.) and the cumulative LD area in μm² per section (mean on 10 consecutive EM ± s.e.m.) (LDs, lipid droplets; *** $p < 0.0001$.)

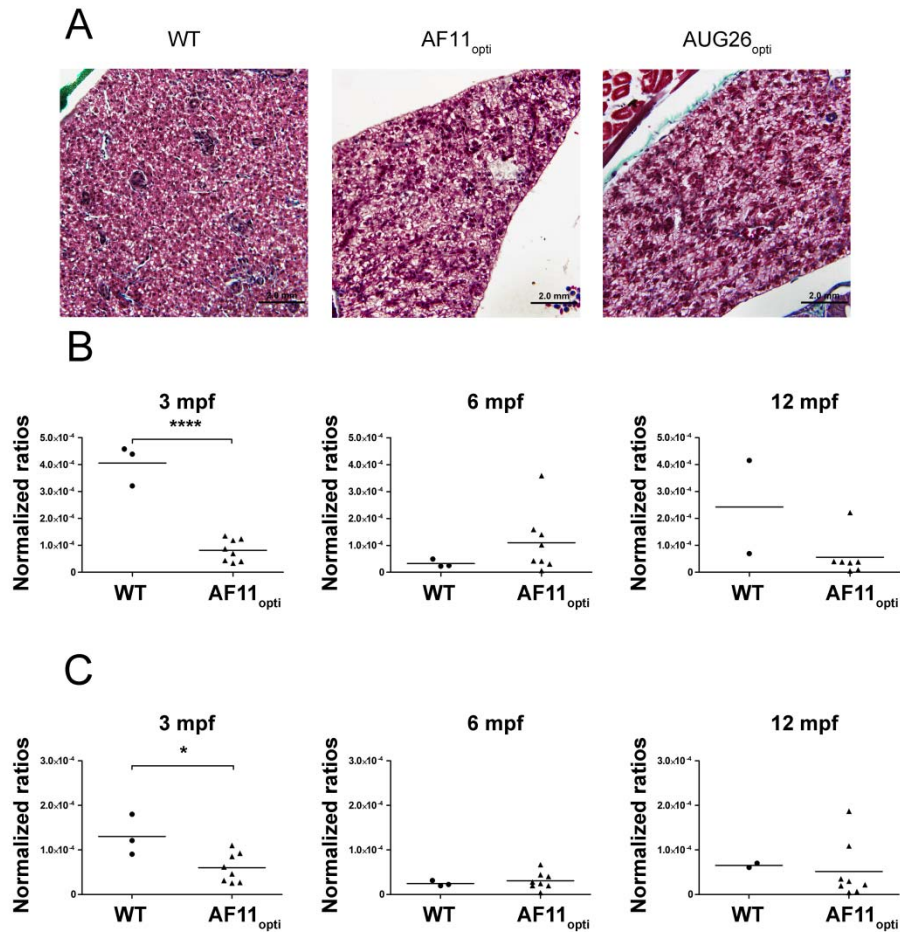


Figure 7. Evaluation of fibrosis in transgenic fish.

(A) Masson's trichrome staining. Paraffin sections from WT and transgenic lines were stained with Masson's trichrome to investigate liver fibrosis. Photomicrographs show livers from WT, AF11_{opti} and AUG26_{opti} adult zebrafish (6 month-old) without accumulation of collagen (stained in blue). **(B) and (C) Expression of fibrosis marker genes.** Quantitative real-time PCR was performed on cDNA synthesized from 3, 6 and 12 month-old WT (n=3) and AF11_{opti} (n=8) total liver mRNA. Each symbol represents the normalized ratio between fibrosis marker genes (TIMP-2 or MMP-2) and 28S rRNA for one fish. No significant increase of TIMP-2 **(B)** or MMP-2 **(C)** expression is observed in transgenic liver, but there is a significant decrease at 3mpf (**** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; MMP-2, matrix metalloproteinase ; mpf, month post fertilization).

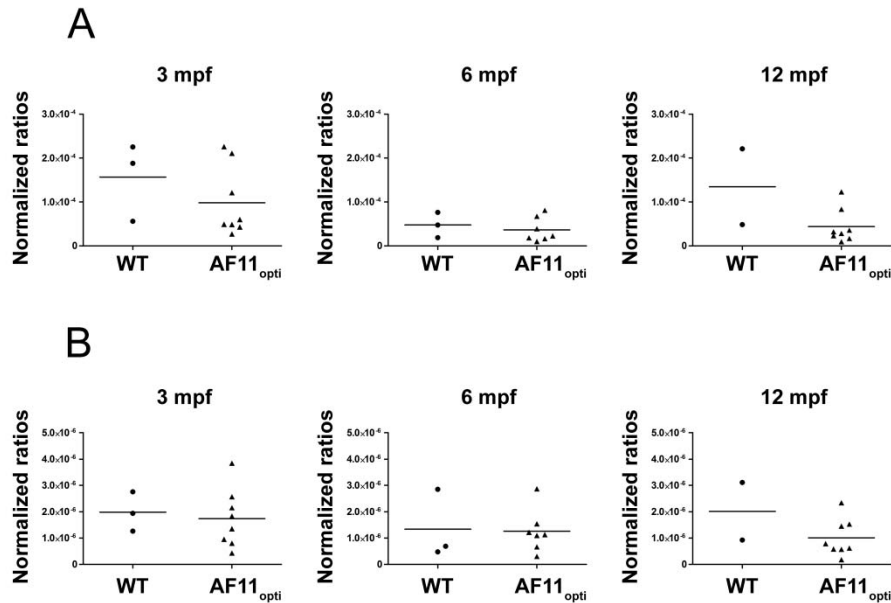


Figure 8. Expression of oncogenesis marker genes.

Quantitative real-time PCR performed on cDNA synthesized from 3, 6 and 12 month-old WT (n=3) and AF11_{opti} (n=8) total liver mRNA. Each symbol represents the normalized ratio between oncogenesis marker genes (p53 or c-myc) and 28S rRNA for one fish. No significant difference in p53 (**A**) or c-myc (**B**) expression is observed between WT and transgenic liver (mpf, month post fertilization).

Acknowledgements

Supported by a catalyst grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Public Health Agency of Canada (PHAC) Strategic Initiative on Hepatitis C, and by an infrastructure grant from Réseau SIDA et maladies infectieuses, Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQS) to H.S. M.Q.V. was the recipient of the Gabriel-Marquis scholarship, Department of Microbiology & Immunology, Université de Montréal, of a Master's scholarship from FRQS, and of a joint scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) and the National Science Council (NSC) of Taiwan. M.D. is a Fellow of the National CIHR Research Training Program in Hepatitis C (NCRTP-HepC). Our EM data were performed at the RIO Electron Microscopy Facility of François Rabelais University (Tours, France).

References

1. Adinolfi, L.E., Gambardella, M., Andreana, A., Tripodi, M.F., Utili, R., Ruggiero, G., 2001. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33, 1358-1364.
2. Ahmad, J., Eng, F.J., Branch, A.D., 2011. HCV and HCC: clinical update and a review of HCC-associated viral mutations in the core gene. *Seminars in liver disease* 31, 347-355.
3. Alter, H.J., Seeff, L.B., 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Seminars in liver disease* 20, 17-35.
4. Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J.P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F., Inchauspe, G., 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 78, 10460-10469.
5. Baril, M., Brakier-Gingras, L., 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic acids research* 33, 1474-1486.

6. Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., Andre, P., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in microbiology* 19, 95-103.
7. Basu, A., Steele, R., Ray, R., Ray, R.B., 2004. Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *The Journal of general virology* 85, 2299-2306.
8. Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., Kanki, J.P., 2005. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *BioTechniques* 39, 227-237.
9. Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., Rice, C.M., 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290, 1972-1974.
10. Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F., Walewski, J.L., 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Seminars in liver disease* 25, 105-117.
11. Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P.J., et al., 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2451-2455.
12. Chu, J., Sadler, K.C., 2009. New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology* 50, 1656-1663.
13. Cohen, J., 2007. Biomedical research. The endangered lab chimp. *Science* 315, 450-452.
14. Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Foka, P., Boumlic, A., Kakkanas, A., Kochlios, E., Khalili, S., Aslanoglou, E., Veletza, S., Orfanoudakis, G., Vassilopoulos, D., Hadziyannis, S.J., Koskinas, J., Mavromara, P., 2011. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *The Journal of general virology* 92, 1343-1351.
15. Depla, M., d'Alteroche, L., Le Gouge, A., Moreau, A., Hourieux, C., Meunier, J.C., Gaillard, J., de Muret, A., Bacq, Y., Kazemi, F., Avargues, A., Roch, E., Piver, E., Gaudy-Graffin, C., Giraudeau, B., Roingeard, P., 2012. Viral sequence variation in

- chronic carriers of hepatitis C virus has a low impact on liver steatosis. *PloS one* 7, e33749.
16. Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J.D., Lavergne, J.P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., Bain, C., 2007. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *The Journal of general virology* 88, 1149-1162.
 17. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 347, 975-982.
 18. GenScript USA Inc, 2012. OptimumGene Codon Optimization. http://www.genscript.com/codon_opt.html
 19. Grabher, C., Look, A.T., 2006. Fishing for cancer models. *Nature biotechnology* 24, 45-46.
 20. Her, G.M., Chiang, C.C., Chen, W.Y., Wu, J.L., 2003a. In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS letters* 538, 125-133.
 21. Her, G.M., Yeh, Y.H., Wu, J.L., 2003b. 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 227, 347-356.
 22. Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Jr., Ott, M., 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature medicine* 16, 1295-1298.
 23. Hernandez-Gea, V., Friedman, S.L., 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* 6, 425-456.
 24. Houghton, M., Abrignani, S., 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436, 961-966.
 25. Hourigan, L.F., Macdonald, G.A., Purdie, D., Whitehall, V.H., Shorthouse, C., Clouston, A., Powell, E.E., 1999. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 29, 1215-1219.

26. Hourieux, C., Patient, R., Morin, A., Blanchard, E., Moreau, A., Trassard, S., Giraudeau, B., Roingeard, P., 2007. The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* 56, 1302-1308.
27. Huang, Y.P., Cheng, J., Zhang, S.L., Wang, L., Guo, J., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, L.Y., Bai, G.Q., Gao, X.S., Ji, D., Lin, S.M., Shao, Q., 2005. Screening of hepatocyte proteins binding to F protein of hepatitis C virus by yeast two-hybrid system. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 5659-5665.
28. Kim, K.H., Hong, S.P., Kim, K., Park, M.J., Kim, K.J., Cheong, J., 2007. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications* 355, 883-888.
29. Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., Murthy, K.R., Buhler, D.R., Liu, E.T., Gong, Z., 2006. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nature biotechnology* 24, 73-75.
30. Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.Y., Weinman, S.A., Lemon, S.M., 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122, 352-365.
31. Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics* 8, 353-367.
32. Liu, W., Chen, J.R., Hsu, C.H., Li, Y.H., Chen, Y.M., Lin, C.Y., Huang, S.J., Chang, Z.K., Chen, Y.C., Lin, C.H., Gong, H.Y., Lin, C.C., Kawakami, K., Wu, J.L., 2012. A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver. *Hepatology* 2012 Jun 22. doi: 10.1002/hep.25914.
33. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
34. Ma, H.C., Lin, T.W., Li, H., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H., Chuang, Y.L., Ou, J.H., Lo, S.Y., 2008. Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and

- enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *Journal of biomedical science* 15, 417-425.
35. Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.
 36. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., Shimotohno, K., 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *Journal of virology* 73, 4713-4720.
 37. McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D., Feinstone, S.M., Rice, C.M., 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2879-2884.
 38. Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., Koike, K., 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *The Journal of general virology* 78 (Pt 7), 1527-1531.
 39. Natarajan, S.K., Eapen, C.E., Pullimood, A.B., Balasubramanian, K.A., 2006. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21, 1240-1249.
 40. Ohata, K., Hamasaki, K., Toriyama, K., Matsumoto, K., Saeki, A., Yanagi, K., Aibiru, S., Nakagawa, Y., Shigeno, M., Miyazoe, S., Ichikawa, T., Ishikawa, H., Nakao, K., Eguchi, K., 2003. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 97, 3036-3043.
 41. Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., Weinman, S.A., 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366-375.
 42. Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chretien, Y., Koike, K., Pessayre, D., Chapman, J., Barba, G., Brechot, C., 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16, 185-194.
43. Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hezode, C., Pawlotsky, J.M., 2008. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* 48, 16-27.
 44. Ratinier, M., Boulant, S., Crussard, S., McLauchlan, J., Lavergne, J.P., 2009. Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus research* 139, 106-110.
 45. Rekha, R.D., Amali, A.A., Her, G.M., Yeh, Y.H., Gong, H.Y., Hu, S.Y., Lin, G.H., Wu, J.L., 2008. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology* 243, 11-22.
 46. Roingard, P., Hourieux, C., 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of viral hepatitis* 15, 157-164.
 47. Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Male, P.J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J.P., Borisch, B., Hadengue, A., Negro, F., 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *Journal of hepatology* 33, 106-115.
 48. Shesheer Kumar, M., Venkateswara Rao, K., Mohammed Habeebullah, C., Dashavantha Reddy, V., 2008. Expression of alternate reading frame protein (F1) of hepatitis C virus in *Escherichia coli* and detection of antibodies for F1 in Indian patients. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8, 374-377.
 49. Shrivastava, A., Manna, S.K., Ray, R., Aggarwal, B.B., 1998. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *Journal of virology* 72, 9722-9728.
 50. Tellinghuisen, T.L., Evans, M.J., von Hahn, T., You, S., Rice, C.M., 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *Journal of virology* 81, 8853-8867.
 51. Troesch, M., Jalbert, E., Canobio, S., Boulassel, M.R., Routy, J.P., Bernard, N.F., Bruneau, J., Lapointe, N., Boucher, M., Soudeyns, H., 2005. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19, 775-784.

52. Tsao, M.L., Chao, C.H., Yeh, C.T., 2006. Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 271-277.
53. Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., Mavromara, P., 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *The Journal of biological chemistry* 277, 17713-17721.
54. Varki, A., 2007. The uncertain future of research chimpanzees. *Science* 315, 1493-1494.
55. Vassilaki, N., Boleti, H., Mavromara, P., 2007. Expression studies of the core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the core protein and proteasomes on the intracellular levels of core+1. *The FEBS journal* 274, 4057-4074.
56. Vassilaki, N., Boleti, H., Mavromara, P., 2008a. Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus research* 133, 123-135.
57. Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P., Bartenschlager, R., 2008b. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *Journal of virology* 82, 11503-11515.
58. Vassilaki, N., Kalliampakou, K.I., Mavromara, P., 2008c. Differences in the expression of the hepatitis C virus core+1 open reading frame between a nuclear and a cytoplasmic expression system. *The Journal of general virology* 89, 222-231.
59. Vassilaki, N., Mavromara, P., 2003. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *The Journal of biological chemistry* 278, 40503-40513.
60. Walewski, J.L., Gutierrez, J.A., Branch-Elliman, W., Stump, D.D., Keller, T.R., Rodriguez, A., Benson, G., Branch, A.D., 2002. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 8, 557-571.
61. Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., Branch, A.D., 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710-721.

62. Wasley, A., Alter, M.J., 2000. Epidemiology of Hepatitis C: Geographic Differences and Temporal Trends. *Seminars in liver disease* Volume 20, 0001-0016.
63. Westin, J., Nordlinder, H., Lagging, M., Norkrans, G., Wejstal, R., 2002. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *Journal of hepatology* 37, 837-842.
64. Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., Schuster, C., 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic acids research* 36, 3054-3064.
65. Wu, W.B., Shao, S.W., Zhao, L.J., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S.Y., Qi, Z.T., 2007. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 50, 341-346.
66. Xu, Z., Choi, J., Lu, W., Ou, J.H., 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 77, 1578-1583.
67. Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J., Ou, J., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO journal* 20, 3840-3848.
68. Yeh, C.T., Lo, S.Y., Dai, D.I., Tang, J.H., Chu, C.M., Liaw, Y.F., 2000. Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *Journal of gastroenterology and hepatology* 15, 182-191.

Discussion

Dans cette étude, la transgénèse *Tol2* nous a permis de générer deux lignées transgéniques de poissons zébrés exprimant deux versions de la protéine F (AF11_{opti} et AUG26_{opti}) spécifiquement au foie. Les codons de ces gènes ont été optimisés afin d'assurer une expression robuste de la protéine F chez le poisson zébré. L'intégration des transgènes dans le génome du poisson zébré ainsi que l'expression des ARNm AF11_{opti} et AUG26_{opti} ont été confirmées. Cependant, en raison de l'absence d'un anticorps anti-F fonctionnel, la présence de la protéine F elle-même n'a pas pu être démontrée. En effet, l'anticorps monoclonal, qui nous a généreusement été fourni par le Dr Lavergne, s'est avéré incapable de reconnaître la protéine F dans les foies des poissons zébrés transgéniques des deux lignées, que ce soit en western blot ou en immunomarquage (données non présentées). Ceci pourrait s'expliquer par une différence entre la séquence peptidique de notre protéine F et celle utilisée lors de la production de l'anticorps monoclonal. Il existe en effet une différence d'un acide aminé dans la région reconnue par l'anticorps, qui est peut-être suffisante pour réduire son efficacité. Aussi, cet anticorps a été testé uniquement sur des cellules transfectées, permettant un haut niveau d'expression de la protéine F. Il est possible que le niveau d'expression de la protéine F dans un modèle *in vivo* ne soit pas suffisant pour permettre à l'anticorps de reconnaître efficacement la protéine. À date, aucune utilisation de cet anticorps sur des coupes ou des extraits de tissus n'a été rapportée. Nous avons également observé une fixation non-spécifique de l'anticorps. Une analyse par *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) a révélé la présence de similarités entre la séquence du peptide ayant servi à l'immunisation et plusieurs protéines de poisson zébré, et ce, dans la région contenant l'épitope reconnu par l'anticorps. Cette observation pourrait expliquer les difficultés rencontrées lors des tentatives de détection de la protéine F sur les échantillons de foie de poissons zébrés transgéniques.

L'analyse histologique des coupes de foie des lignées transgéniques F2 a révélé la présence de vacuolations cytoplasmiques, indiquant une accumulation lipidique anormale au sein des hépatocytes. Ces altérations morphologiques témoignent d'une accumulation de gouttelettes lipidiques (GL) et de la présence de stéatose microvésiculaire, une pathologie hépatique observée chez près de 50% des patients infectés chroniquement par le VHC

(Roingeard et Hourieux, 2008). Des études précédentes ayant démontré que la transgénèse par injection des vecteurs pT2-LF-tTA et pT2-GFP-BI (ciblant l'expression de la GFP au foie) n'induit pas de lésion ou de pathologie hépatiques (Liu et al., 2012), l'expression de la protéine F est vraisemblablement responsable des dommages hépatiques observés chez les deux lignées transgéniques. Ce phénotype a été confirmé par des marquages histologiques au *Oil Red O* (ORO), par microscopie électronique à transmission et par analyse d'image quantitative, une technique permettant une mesure précise de la superficie cumulée couverte par les GL. Cette approche expérimentale a démontré la présence d'une accumulation significative de GL dans les hépatocytes des lignées transgéniques. La présence de cette accumulation lipidique dans les foies des poissons AUG26_{opti} suggère que les 26 premiers acides aminés de la protéine F ne sont pas indispensables pour l'établissement de ce phénotype. Cependant, l'analyse d'image quantitative a révélé une différence, faible mais néanmoins significative, entre les deux lignées transgéniques, les foies AF11_{opti} présentant plus de GL et une surface cumulée plus importante que les foies AUG26_{opti}. Ces observations suggèrent que la portion N-terminale de la protéine produite par le gène AF11_{opti}, qui est identique aux 11 premiers codons de la protéine core du VHC, pourrait accroître les effets prostéatosiques induits par la portion restante de la protéine F (c'est-à-dire située en aval du codon 26). Par ailleurs, les deux constructions possédant le codon initiateur AUG en position 85/87, l'expression de la forme courte de la protéine F (core +1/S) dans les foies des poissons transgéniques et son implication dans la pathogénèse ne peuvent être exclues. Les deux séquences de F utilisées dans notre étude sont dérivées de VHC de génotype 1a, et nos résultats montrent que toutes deux sont associées au développement d'un phénotype propre à la stéatose hépatique microvésiculaire chez les deux lignées de poissons zébrés transgéniques. Or, plusieurs études cliniques ont noté que les patients infectés par le VHC de génotype 3 souffraient de stéatose hépatique plus sévère que dans les cas d'infections aux autres génotypes (Adinolfi et al., 2001; Rubbia-Brandt et al., 2000). De plus, Piodi et al. ont démontré que l'expression de la protéine core de génotype 3 induit l'accumulation de GL plus grosses que la protéine core de génotype 1 (Piodi et al., 2008). Il serait donc intéressant de générer des lignées de poissons zébrés transgéniques exprimant la protéine F de génotype 3 et déterminer si la sévérité de la stéatose s'en trouve modifiée. La corrélation potentielle entre la sévérité de la stéatose et la séquence de la protéine core a été récemment étudiée par Depla et

al. chez des patients infectés chroniquement, mais aucune association n'a pu être démontrée (Depla et al., 2012). Cependant, on peut supposer que le développement de stéatose sévère pourrait être lié à la séquence peptidique de la protéine F, qui est moins bien conservée que celle de la protéine core (Walewski et al., 2002). Ensemble, ces données démontrent l'implication de la protéine F dans la régulation du métabolisme lipidique du foie, hypothèse qui a déjà été soulevée dans plusieurs études précédentes. En effet, dans un système de levure double hybride, Huang et al. ont identifié plusieurs partenaires d'interaction de la protéine F étant impliqués dans le métabolisme des lipides (Huang et al., 2005). De plus, des analyses bio-informatiques de la séquence de la protéine F ont révélé la présence d'un site de fixation au récepteur au LDL de classe B (Shesheer Kumar et al., 2008), et d'une région (acides aminés 72-115) hautement similaire au domaine transmembranaire du transporteur ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*), une protéine jouant un rôle clé dans le transport de cholestérol et des phospholipides cellulaires vers les HDL (Vassilaki et al., 2007).

On sait que la réplication du VHC est étroitement liée au métabolisme des lipides, la présence des GL étant requise pour l'assemblage et la production efficace de particules virales infectieuses (Bartenschlager et al., 2011). Par conséquent, l'implication de la protéine F dans la perturbation du trafic des GL concorderait avec son importance présumée dans la propagation et la survie du virus, notamment suggérée par le haut degré de conservation de sa séquence au sein des génotypes (Walewski et al., 2001) et par son association avec la préfoldine-2 menant à l'altération du cytosquelette de tubuline (Tsao et al., 2006). De plus, le développement de stéatose ayant été observé chez des souris transgéniques exprimant la protéine core (Lerat et al., 2002; Moriya et al., 1997), une réévaluation de la contribution respective des protéines F et core dans cette pathogenèse devrait être envisagée.

Une étude récente a démontré que core peut accéder aux GL en interagissant avec la diacylglycérol acyltransférase-1 (DGAT1), une enzyme clé de la synthèse des triglycérides (TG) (Herker et al., 2010). Cette localisation permettrait à la protéine core de stabiliser les GL, assurant ainsi l'efficacité de l'assemblage viral. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si la protéine F est également capable de co-localiser avec les GL et de jouer un rôle dans l'altération du métabolisme des TG. Cependant, ces études sont actuellement limitées par l'absence d'anticorps monoclonaux anti-F fonctionnels et par le fait que le marquage de

l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine F peut biaiser sa localisation cellulaire (Ratinier et al., 2009). Plusieurs autres mécanismes par lesquels core induit l'accumulation de lipides ont été décrits. En effet, la protéine core provoque l'inhibition de l'activité du MTP (Perlemuter et al., 2002), une protéine majeure dans l'assemblage des lipoprotéines, et interfère avec l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras, tels que SREBP ou PPAR α/γ (Kim et al., 2007). Cependant, il reste difficile de savoir si ces changements moléculaires sont directement ou indirectement liés à l'activité de la protéine core. Il est donc possible que la protéine F soit impliquée dans ces mécanismes, expliquant ainsi en partie pourquoi aucune interaction directe entre la protéine core et SREBP ou PPAR α/γ n'a été démontrée à ce jour.

D'autres études ont montré que la protéine core contribue indirectement au développement de stéatose en provoquant un stress oxydatif par l'intermédiaire de l'inhibition de la β -oxydation et l'induction de dommages oxydatifs dans les mitochondries (Okuda et al., 2002). Puisque la protéine F a été localisée aux mitochondries (Ratinier et al., 2009), l'accumulation de lipides pourrait éventuellement être due au rôle potentiellement pro-oxydant de la protéine F. Enfin, l'examen histologique du foie des lignées de poissons zébrés transgéniques AF11_{opti} et AUG26_{opti} démontre la présence de stéatose microvesiculaire ; or la β -oxydation a été décrite comme un cofacteur promouvant le développement de ce phénotype (Natarajan et al. 2006).

La fibrose hépatique est fréquemment observée chez les patients infectés au VHC (Adinolfi et al., 2001; Hourigan et al., 1999; Westin et al., 2002). L'analyse histologique des foies des poissons AF11_{opti} et AUG26_{opti} après coloration au trichrome de Masson, ainsi que la mesure des niveaux d'expression des gènes marqueurs de fibrose, n'ont révélé aucun signe de cette pathologie. Par conséquent, nos résultats ne témoignent pas du rôle de la protéine F dans l'établissement de la fibrose hépatique, même si son implication potentielle lors de l'infection naturelle au VHC ne peut être exclue.

Des études antérieures ont également suggéré l'influence de la protéine F sur l'oncogenèse et le développement de CHC. Des mutations dans les séquences signalant le changement de cadre de lecture nécessaire à l'expression de la protéine F ont été observées plus fréquemment chez les individus infectés au VHC souffrant de CHC (Yeh et al., 2000). De

plus, Dalagiorgou et al. ont démontré la présence de niveaux plus élevés d'anticorps dirigés contre la protéine F chez les patients atteints de CHC que chez les individus chroniquement infectés (Dalagiorgou et al., 2011). La protéine F s'est avérée capable de réguler négativement p53 et de façon positive c-myc, dans des cellules HepG2 d'hépatome humain (Wu et al., 2007). Aussi, des expériences de levure double-hybride ont révélé l'existence d'une interaction physique entre la protéine F et MM-1, un inhibiteur de la transactivation de c-myc, aboutissant à l'augmentation de l'activité de c-myc (Ma et al., 2008). Par ailleurs, la stéatose hépatique est un facteur pouvant contribuer au développement de la carcinogenèse au foie (Ohata et al., 2003; Roingard and Hourieux, 2008). C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si des phénomènes similaires étaient observables sur nos lignées de poissons zébrés transgéniques. Étonnamment, nos résultats n'ont révélé aucune modification des niveaux d'expression des ARNm de p53 ou de c-myc. Ces divergences entre nos données et celles des études précédentes pourraient s'expliquer par le système expérimental utilisé, soit une étude *in vivo* contre l'utilisation d'une lignée de cellules transformées dans lesquelles les profils d'expression peuvent différer de ceux observés dans des hépatocytes primaires. Il se peut également que certains cofacteurs responsables de l'oncogenèse observée dans les études citées précédemment soient absents dans notre modèle de poisson zébré.

Conclusion

En conclusion, nous avons étudié pour la première fois l'expression de la protéine F du VHC et la pathogenèse hépatique qui lui est associée dans un modèle *in vivo*. L'implication de la protéine F dans le développement de stéatose hépatique, rôle jusqu'à présent attribué principalement à la protéine core, a été démontrée à travers trois différentes approches analytiques. Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la protéine F induit l'accumulation de GL restent à être caractérisés, les premières hypothèses que l'on peut émettre sont la modulation du métabolisme lipidique, l'interférence avec le trafic normal des GL, et l'altération de la fonction mitochondriale. De plus, les données expérimentales présentées ici pourraient mener à une réévaluation des propriétés biologiques respectives de protéines core et F, ainsi qu'à une réattribution de leurs interactions fonctionnelles (Wolf et al., 2008).

En revanche, l'expression de la protéine F n'a pas induit de fibrose ou le développement de CHC dans notre modèle. Toutefois, l'implication potentielle de la protéine F dans la carcinogenèse et/ou dans l'établissement de dommages hépatiques dans le contexte de l'infection naturelle au VHC ne peut être exclue.

Une meilleure compréhension des rôles des protéines produites par le VHC est cruciale pour le développement de nouvelles stratégies antivirales. En accord avec d'autres rapports récents, cette étude contribue à l'établissement et à la validation du poisson zébré transgénique comme un modèle *in vivo* pertinent dans le domaine de la virologie et de la recherche sur les lipides.

Bibliographie

1. Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* 9, 400-414.
2. Adinolfi, L.E., Gambardella, M., Andreana, A., Tripodi, M.F., Utili, R., Ruggiero, G., 2001. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33, 1358-1364.
3. Alter, H.J., Seeff, L.B., 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Seminars in liver disease* 20, 17-35.
4. Alter, M.J., 1995. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Seminars in liver disease* 15, 5-14.
5. Alter, M.J., 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26, 62S-65S.
6. Amali, A.A., Rekha, R.D., Lin, C.J., Wang, W.L., Gong, H.Y., Her, G.M., Wu, J.L., 2006. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *Journal of biomedical science* 13, 225-232.
7. Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J.P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F., Inchauspe, G., 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 78, 10460-10469.
8. Baril, M., Brakier-Gingras, L., 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic acids research* 33, 1474-1486.
9. Bartenschlager, R., 2005. The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *Journal of hepatology* 43, 210-216.
10. Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., Andre, P., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in microbiology* 19, 95-103.
11. Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.L., 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine* 197, 633-642.

12. Basu, A., Steele, R., Ray, R., Ray, R.B., 2004. Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *The Journal of general virology* 85, 2299-2306.
13. Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., Rice, C.M., 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290, 1972-1974.
14. Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., Lavergne, J.P., 2003. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *The Journal of biological chemistry* 278, 45785-45792.
15. Boulant, S., Douglas, M.W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., McLauchlan, J., 2008. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 9, 1268-1282.
16. Bukh, J., 2004. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469-1475.
17. Bukh, J., 2012. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 142, 1279-1287 e1273.
18. Bukh, J., Meuleman, P., Tellier, R., Engle, R.E., Feinstone, S.M., Eder, G., Satterfield, W.C., Govindarajan, S., Krawczynski, K., Miller, R.H., Leroux-Roels, G., Purcell, R.H., 2010. Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *The Journal of infectious diseases* 201, 1381-1389.
19. Chu, J., Sadler, K.C., 2009. New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology* 50, 1656-1663.
20. Chuang, W.C., Allain, J.P., 2008. Differential reactivity of putative genotype 2 hepatitis C virus F protein between chronic and recovered infections. *The Journal of general virology* 89, 1890-1900.
21. Cinaroglu, A., Gao, C., Imrie, D., Sadler, K.C., 2011. Activating transcription factor 6 plays protective and pathological roles in steatosis due to endoplasmic reticulum stress in zebrafish. *Hepatology* 54, 495-508.
22. Coelmont, L., Hanoulle, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., Lim, P., Vliegen, I., Paeshuyse, J., Vuagniaux, G., Vandamme, A.M., Bartenschlager, R., Gallay, P., Lippens, G., Neyts, J., 2010. DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus

- replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PloS one* 5, e13687.
23. Cohen, J., 2007. Biomedical research. The endangered lab chimp. *Science* 315, 450-452.
 24. Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Foka, P., Boumlic, A., Kakkanas, A., Kochlios, E., Khalili, S., Aslanoglou, E., Veletza, S., Orfanoudakis, G., Vassilopoulos, D., Hadziyannis, S.J., Koskinas, J., Mavromara, P., 2011. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *The Journal of general virology* 92, 1343-1351.
 25. Depla, M., d'Alteroche, L., Le Gouge, A., Moreau, A., Hourieux, C., Meunier, J.C., Gaillard, J., de Muret, A., Bacq, Y., Kazemi, F., Avargues, A., Roch, E., Piver, E., Gaudy-Graffin, C., Giraudeau, B., Roingeard, P., 2012. Viral sequence variation in chronic carriers of hepatitis C virus has a low impact on liver steatosis. *PloS one* 7, e33749.
 26. Ding, C.B., Zhang, J.P., Zhao, Y., Peng, Z.G., Song, D.Q., Jiang, J.D., 2011. Zebrafish as a potential model organism for drug test against hepatitis C virus. *PloS one* 6, e22921.
 27. Disson, O., Hahne, M., Hibner, U., Lerat, H., 2002. Hepatocytes transgenic for the full hepatitis C virus open reading frame are resistant to fas-induced cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 973, 214-217.
 28. Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., Law, M., Rice, C.M., Ploss, A., 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208-211.
 29. Dou, J., Liu, P., Wang, J., Zhang, X., 2006. Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21, 1794-1800.
 30. Drouin, C., Lamarche, S., Bruneau, J., Soudeyns, H., Shoukry, N.H., 2010. Cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus (HCV) alternate reading frame protein (ARFP) are undetectable during acute infection. *Journal of clinical*

- virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 47, 102-103.
31. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology* 76, 5974-5984.
 32. Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J.D., Lavergne, J.P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., Bain, C., 2007. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *The Journal of general virology* 88, 1149-1162.
 33. Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R., 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of virology* 75, 12047-12057.
 34. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 347, 975-982.
 35. Gao, D.Y., Jin, G.D., Yao, B.L., Zhang, D.H., Gu, L.L., Lu, Z.M., Gong, Q., Lone, Y.C., Deng, Q., Zhang, X.X., 2010. Characterization of the specific CD4+ T cell response against the F protein during chronic hepatitis C virus infection. *PloS one* 5, e14237.
 36. Gao, D.Y., Zhang, X.X., Hou, G., Jin, G.D., Deng, Q., Kong, X.F., Zhang, D.H., Ling, Y., Yu, D.M., Gong, Q.M., Zhan, Q., Yao, B.L., Lu, Z.M., 2008. Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from Chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavarin. *Journal of clinical microbiology* 46, 3746-3751.
 37. Guo, J., Cheng, J., Ji, D., Zhao, L.F., Gao, X.S., Liu, Y., Wu, S.H., 2005. [Screening and cloning target genes transactivated by hepatitis C virus F protein using suppression subtractive hybridization technique]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* 13, 660-663.
 38. Hadziyannis, S.J., Sette, H., Jr., Morgan, T.R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P.J., Lin, A., Ackrill, A.M., Group, P.I.S., 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin

- combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of internal medicine* 140, 346-355.
39. Hahn, C.S., Cho, Y.G., Kang, B.S., Lester, I.M., Hahn, Y.S., 2000. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 276, 127-137.
 40. Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Jr., Ott, M., 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature medicine* 16, 1295-1298.
 41. Herker, E., Ott, M., 2011. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22, 241-248.
 42. Holtta-Vuori, M., Salo, V.T., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., Ikonen, E., 2010. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *The Biochemical journal* 429, 235-242.
 43. Houghton, M., 2011. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunological reviews* 239, 99-108.
 44. Hourigan, L.F., Macdonald, G.A., Purdie, D., Whitehall, V.H., Shorthouse, C., Clouston, A., Powell, E.E., 1999. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 29, 1215-1219.
 45. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., McKeating, J.A., 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7271-7276.
 46. Huang, Y.P., Cheng, J., Zhang, S.L., Wang, L., Guo, J., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, L.Y., Bai, G.Q., Gao, X.S., Ji, D., Lin, S.M., Shao, Q., 2005. Screening of hepatocyte proteins binding to F protein of hepatitis C virus by yeast two-hybrid system. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 5659-5665.
 47. Hugo, S.E., Cruz-Garcia, L., Karanth, S., Anderson, R.M., Stainier, D.Y., Schlegel, A., 2012. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes & development* 26, 282-293.

48. Ina, Y., Mizokami, M., Ohba, K., Gojobori, T., 1994. Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *Journal of molecular evolution* 38, 50-56.
49. Jiao, J., Wang, J., Sallberg, M., 2010. Effects of HCV proteins in current HCV transgenic models. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 40, 115-124.
50. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808-1817.
51. Kawakami, K., 2007. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology* 8 Suppl 1, S7.
52. Kawakami, K., Koga, A., Hori, H., Shima, A., 1998. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 225, 17-22.
53. Kawakami, K., Shima, A., 1999. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244.
54. Kawakami, K., Shima, A., Kawakami, N., 2000. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11403-11408.
55. Kim, K.H., Hong, S.P., Kim, K., Park, M.J., Kim, K.J., Cheong, J., 2007. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications* 355, 883-888.
56. Koga, A., Inagaki, H., Bessho, Y., Hori, H., 1995. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Molecular & general genetics : MGG* 249, 400-405.
57. Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y., Hori, H., 1996. Transposable element in fish. *Nature* 383, 30.
58. Komurian-Pradel, F., Rajoharison, A., Berland, J.L., Khouri, V., Perret, M., Van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F., Paranhos-Baccala, G., 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40, 900-909.

59. Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., Murthy, K.R., Buhler, D.R., Liu, E.T., Gong, Z., 2006. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nature biotechnology* 24, 73-75.
60. Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H., 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.
61. Legrand, N., Ploss, A., Balling, R., Becker, P.D., Borsotti, C., Brezillon, N., Debarry, J., de Jong, Y., Deng, H., Di Santo, J.P., Eisenbarth, S., Eynon, E., Flavell, R.A., Guzman, C.A., Huntington, N.D., Kremsdorf, D., Manns, M.P., Manz, M.G., Mention, J.J., Ott, M., Rathinam, C., Rice, C.M., Rongvaux, A., Stevens, S., Spits, H., Strick-Marchand, H., Takizawa, H., van Lent, A.U., Wang, C., Weijer, K., Willinger, T., Ziegler, P., 2009. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell host & microbe* 6, 5-9.
62. Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.Y., Weinman, S.A., Lemon, S.M., 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122, 352-365.
63. Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics* 8, 353-367.
64. Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M.O., Ward, A.C., Layton, J.E., 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087-3096.
65. Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626.
66. Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938.
67. Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., Bartenschlager, R., 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *Journal of virology* 75, 1437-1449.

68. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
69. Ma, H.C., Lin, T.W., Li, H., Iguchi-Arigo, S.M., Ariga, H., Chuang, Y.L., Ou, J.H., Lo, S.Y., 2008. Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *Journal of biomedical science* 15, 417-425.
70. Machida, K., Tsukiyama-Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., Hayashi, Y., Funata, N., Taya, C., Yonekawa, H., Kohara, M., 2001. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *The Journal of biological chemistry* 276, 12140-12146.
71. Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.
72. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., Shimotohno, K., 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *Journal of virology* 73, 4713-4720.
73. Matthews, R.P., Lorent, K., Manoral-Mobias, R., Huang, Y., Gong, W., Murray, I.V., Blair, I.A., Pack, M., 2009. TNFalpha-dependent hepatic steatosis and liver degeneration caused by mutation of zebrafish S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Development* 136, 865-875.
74. Meeker, N.D., Trede, N.S., 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Developmental and comparative immunology* 32, 745-757.
75. Moorman, J.P., Prayther, D., McVay, D., Hahn, Y.S., Hahn, C.S., 2003. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology* 312, 320-329.
76. Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology* 5, 453-463.

77. Morice, Y., Ratinier, M., Miladi, A., Chevaliez, S., Germanidis, G., Wedemeyer, H., Laperche, S., Lavergne, J.P., Pawlotsky, J.M., 2009. Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. *Hepatology* 49, 1449-1459.
78. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., Koike, K., 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature medicine* 4, 1065-1067.
79. Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., Koike, K., 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *The Journal of general virology* 78 (Pt 7), 1527-1531.
80. Natarajan, S.K., Eapen, C.E., Pullimood, A.B., Balasubramanian, K.A., 2006. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21, 1240-1249.
81. Ohata, K., Hamasaki, K., Toriyama, K., Matsumoto, K., Saeki, A., Yanagi, K., Abiru, S., Nakagawa, Y., Shigeno, M., Miyazoe, S., Ichikawa, T., Ishikawa, H., Nakao, K., Eguchi, K., 2003. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 97, 3036-3043.
82. Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., Weinman, S.A., 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366-375.
83. Otsuka, M., Kato, N., Lan, K., Yoshida, H., Kato, J., Goto, T., Shiratori, Y., Omata, M., 2000. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *The Journal of biological chemistry* 275, 34122-34130.
84. Passeri, M.J., Cinaroglu, A., Gao, C., Sadler, K.C., 2009. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 49, 443-452.
85. Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chretien, Y., Koike, K., Pessayre, D., Chapman, J., Barba, G., Brechot, C., 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density

- lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 185-194.
86. Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., Bartenschlager, R., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7408-7413.
 87. Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hezode, C., Pawlotsky, J.M., 2008. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* 48, 16-27.
 88. Ploss, A., Evans, M.J., 2012. Hepatitis C virus host cell entry. *Current opinion in virology* 2, 14-19.
 89. Ploss, A., Rice, C.M., 2009. Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO reports* 10, 1220-1227.
 90. Ratnier, M., Boulant, S., Crussard, S., McLauchlan, J., Lavergne, J.P., 2009. Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus research* 139, 106-110.
 91. Ray, R.B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B.B., Ray, R., 1998. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *The Journal of biological chemistry* 273, 2256-2259.
 92. Ray, R.B., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., 1997. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *The Journal of biological chemistry* 272, 10983-10986.
 93. Rekha, R.D., Amali, A.A., Her, G.M., Yeh, Y.H., Gong, H.Y., Hu, S.Y., Lin, G.H., Wu, J.L., 2008. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology* 243, 11-22.
 94. Roingeard, P., Hourieux, C., 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of viral hepatitis* 15, 157-164.

95. Rong, L., Dahari, H., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., 2010. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Science translational medicine* 2, 30ra32.
96. Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J., Wychowski, C., 2003. Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *The Journal of general virology* 84, 1751-1759.
97. Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Male, P.J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J.P., Borisch, B., Hadengue, A., Negro, F., 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *Journal of hepatology* 33, 106-115.
98. Sabile, A., Perlemuter, G., Bono, F., Kohara, K., Demaugre, F., Kohara, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Brechot, C., Barba, G., 1999. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 30, 1064-1076.
99. Sadler, K.C., Amsterdam, A., Soroka, C., Boyer, J., Hopkins, N., 2005. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease. *Development* 132, 3561-3572.
100. Shepard, C.W., Finelli, L., Alter, M.J., 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases* 5, 558-567.
101. Shesheer Kumar, M., Venkateswara Rao, K., Mohammed Habeebullah, C., Dashavantha Reddy, V., 2008. Expression of alternate reading frame protein (F1) of hepatitis C virus in *Escherichia coli* and detection of antibodies for F1 in Indian patients. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8, 374-377.
102. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I.T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
103. Smith, D.B., Simmonds, P., 1997. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *Journal of molecular evolution* 45, 238-246.

104. Tellinghuisen, T.L., Evans, M.J., von Hahn, T., You, S., Rice, C.M., 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *Journal of virology* 81, 8853-8867.
105. Thakur, P.C., Stuckenholtz, C., Rivera, M.R., Davison, J.M., Yao, J.K., Amsterdam, A., Sadler, K.C., Bahary, N., 2011. Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in *cdipt*-deficient zebrafish. *Hepatology* 54, 452-462.
106. Thomas, S.L., Newell, M.L., Peckham, C.S., Ades, A.E., Hall, A.J., 1998. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *International journal of epidemiology* 27, 108-117.
107. Tran, G., 2008. The role of hepatitis C virus in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Bioscience Horizons* 1, 167-175.
108. Troesch, M., Jalbert, E., Canobio, S., Boulassel, M.R., Routy, J.P., Bernard, N.F., Bruneau, J., Lapointe, N., Boucher, M., Soudeyns, H., 2005. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19, 775-784.
109. Tsao, M.L., Chao, C.H., Yeh, C.T., 2006. Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 271-277.
110. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A., 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 66, 1476-1483.
111. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., Miyamura, T., 2002. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937-946.
112. van der Sar, A.M., Appelmelk, B.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Bitter, W., 2004. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in microbiology* 12, 451-457.
113. van der Velden, Y.U., Wang, L., Zevenhoven, J., van Rooijen, E., van Lohuizen, M., Giles, R.H., Clevers, H., Haramis, A.P., 2011. The serine-threonine kinase LKB1 is essential for survival under energetic stress in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4358-4363.

114. Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., Mavromara, P., 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *The Journal of biological chemistry* 277, 17713-17721.
115. Vassilaki, N., Boleti, H., Mavromara, P., 2007. Expression studies of the core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the core protein and proteasomes on the intracellular levels of core+1. *The FEBS journal* 274, 4057-4074.
116. Vassilaki, N., Boleti, H., Mavromara, P., 2008a. Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus research* 133, 123-135.
117. Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P., Bartenschlager, R., 2008b. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *Journal of virology* 82, 11503-11515.
118. Vassilaki, N., Kalliampakou, K.I., Mavromara, P., 2008c. Differences in the expression of the hepatitis C virus core+1 open reading frame between a nuclear and a cytoplasmic expression system. *The Journal of general virology* 89, 222-231.
119. Vassilaki, N., Mavromara, P., 2003. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *The Journal of biological chemistry* 278, 40503-40513.
120. Vassilaki, N., Mavromara, P., 2009. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB life* 61, 739-752.
121. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11, 791-796.
122. Walewski, J.L., Gutierrez, J.A., Branch-Elliman, W., Stump, D.D., Keller, T.R., Rodriguez, A., Benson, G., Branch, A.D., 2002. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 8, 557-571.
123. Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., Branch, A.D., 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710-721.

124. Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A., 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of virology* 67, 3338-3344.
125. Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., Su, L., 2011. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140, 1334-1344.
126. Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., Jacobson, I., 2012. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 61 Suppl 1, i36-46.
127. Westin, J., Nordlinder, H., Lagging, M., Norkrans, G., Wejstal, R., 2002. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *Journal of hepatology* 37, 837-842.
128. White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., Zon, L.I., 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell stem cell* 2, 183-189.
129. Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., Schuster, C., 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic acids research* 36, 3054-3064.
130. Wu, W.B., Shao, S.W., Zhao, L.J., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S.Y., Qi, Z.T., 2007. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 50, 341-346.
131. Xu, Z., Choi, J., Lu, W., Ou, J.H., 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 77, 1578-1583.
132. Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J., Ou, J., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO journal* 20, 3840-3848.
133. Yeh, C.T., Lo, S.Y., Dai, D.I., Tang, J.H., Chu, C.M., Liaw, Y.F., 2000. Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *Journal of gastroenterology and hepatology* 15, 182-191.

134. Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M., Yoshimura, A., 2002. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *The Journal of experimental medicine* 196, 641-653.
135. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., Chisari, F.V., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9294-9299.
136. Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., Lai, M.M., 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *Journal of virology* 72, 3691-3697.

