



Mise en évidence de variants de la protéine de capside du virus de l'Hépatite C et de leurs effets sur la signalisation du TGF-__

François Rimlinger

► To cite this version:

François Rimlinger. Mise en évidence de variants de la protéine de capside du virus de l'Hépatite C et de leurs effets sur la signalisation du TGF-__. Virologie. 2011. hal-01479192

HAL Id: hal-01479192

<https://ephe.hal.science/hal-01479192>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

Par

François Rimlinger

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

Mise en évidence de variants de la protéine de capsid du virus de l'Hépatite C et de leurs effets sur la signalisation du TGF- α .

Soutenu le 9 décembre 2011 devant le jury suivant :

Mme Sophie Gad-Lapiteau	Président
Mme Valérie Thiers	Tuteur scientifique
Mme Marie Françoise Bourgeade	Tuteur scientifique
Mme Flore Renaud-Paitra	Tuteur pédagogique
Mme Dina Kremsdorf	Rapporteur
M. Philippe Chouteau	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Valérie Thiers et	valerie.thiers@pasteur.fr
Marie-Françoise Bourgeade	marion.bourgeade@inserm.fr
Laboratoire INSERM U785	
Hôpital Paul Brousse	94807 Villejuif
Directeur : Didier Samuel	

Et de :

Flore Renaud-Paitra	flore.renaud@uvsq.fr
Laboratoire de Génétique et de Biologie Cellulaire	
UMR 8159 CNRS/UVSQ/EPHE	78035 Versailles
Directeur : Bernard Mignotte	
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)	

Sommaire

RÉSUMÉ	6
Liste des abréviations	7
I. Introduction	8
I.1 L'Hépatite C	8
I.1.1 Découverte de l'agent responsable de la maladie	8
I.1.2 Épidémiologie	8
I.1.3 Modes de transmission et Facteurs de risques	9
I.1.4 Physiopathologie	10
I.1.4.1 Histoire naturelle de l'infection	10
I.1.4.2 De la phase aiguë au carcinome hépatocellulaire	10
I.1.4.3 Pathologies extra hépatiques	11
I.1.5 Techniques de diagnostic et Dépistage du VHC	11
I.1.5.1 Tests sérologiques	11
I.1.5.2 Tests moléculaires	12
I.2 Le virus de l'Hépatite C	12
I.2.1 Variabilité génomique du VHC : du génotype à la quasi-espèce	13
I.2.2 Organisation génomique du VHC	15
I.2.2.1 La région 5' non codante	15
I.2.2.2 La phase ouverte de lecture	15
I.2.2.3 La région 3' non codante	16
I.2.2.4 Modèles d'étude	16
I.2.2.5 Cycle viral	17
I.2.3 Structure et fonction des protéines virales	19
I.2.3.1 Les protéines structurales	19
I.2.3.1.1 La protéine de capsid	19
I.2.3.1.2 La protéine ARFP	20
I.2.3.1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	20
I.2.3.1.4 La protéine p7	21
I.2.3.2 Les protéines non structurales	22
I.2.3.2.1 La protéine NS2	22
I.2.3.2.2 La protéine NS3	22
I.2.3.2.3 La protéine NS4A	23
I.2.3.2.4 La protéine NS4B	23
I.2.3.2.5 La protéine NS5A	24
I.2.3.2.6 La protéine NS5B	24
I.2.4 Traitements et thérapeutiques	25
I.3 La protéine de capsid du VHC.	26
I.4 Le TGF-α	28
I.5 Objectif du travail	32
II Matériels et Méthodes	34
II.1 Matériels	34
II.1.1 Prélèvements étudiés et sélection des capsides de VHC d'intérêt.	34
II.1.2 Vecteurs plasmidiques	35
II.1.2.1 TA Cloning	35
II.1.2.2 pRSV	35
II.1.2.3 p3xFLAG-CMV TM -10	35
II.1.2.4 pCAGA-luc	36
II.1.2.5 pRenilla	36
II.1.3 Souches bactériennes	36
II.1.4 Lignée cellulaire	36
II.1.4.1 Lignée hépatocytaire (HuH-7)	36
II.2 Méthodes de Biologie Moléculaire et cellulaire	37

II.2.1 Méthodes concernant les acides nucléiques	37
II.2.1.1 Extraction de l'ARN viral et retro transcription	37
II.2.1.2 Amplification et préparation de fragments d'ADN	38
II.2.1.3 Ligation et transformation de bactéries compétentes	38
II.2.1.4 Préparations d'ADN plasmidique	39
II.2.1.5 Sous clonage en vecteur d'expression eucaryote (pRSV et p3xFLAG-CMV™-10)	40
II.2.1.6 Analyses phylogénétiques des séquences de capsides de patients	41
II.3 Méthodes concernant les Techniques de biologie cellulaire	42
II.3.1 Transfection transitoire dans les lignées cellulaires	42
II.3.2 Test luciférase - Dosage de la luciférase	43
II.3.3 Western blot	43
II.3.3.1 Préparation de lysats cellulaires	43
II.3.3.2 Gels Tris glycine, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	44
II.3.3.3 Transfert sur membrane de Nitrocellulose	45
II.3.3.4 Immunodétection des protéines transférées	45
II.3.4 Immunodétection de la protéine de capsid en Fluorescence	46
III. Résultats	47
III.1 Analyse phylogénétique des séquences de la protéine de capsid	47
III.2 Modulation de la voie de signalisation du TGF- β par les différents variants de protéines de capsid	51
III.3 Activation du TGF- β latent par la protéine de capsid	53
III.4 Localisation cellulaire de la protéine de Capsid	54
IV. Discussion	55
V. Conclusion et perspectives	61
Bibliographie	63
Annexes	70

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Mise en évidence des variants de la protéine de capsid du virus de l'Hépatite C, et de leurs effets sur la signalisation du TGF- β .

François Rimlinger

Soutenu le 9 décembre 2011

RÉSUMÉ

Le Virus de l'Hépatite C (VHC) est l'une des premières causes de pathologie hépatique dans le monde. Ce virus à ARN est responsable de l'hépatite C qui aboutit au développement de la fibrose et du cancer du foie. Le VHC, présente une hétérogénéité génétique importante chez les malades infectés qui se traduit par la présence d'une population virale hétérogène chez un même individu appelée quasi-espèce. La protéine de capsid du VHC est le constituant principal de la nucléocapsid et possède également la capacité d'interagir avec plusieurs protéines cellulaires et ainsi de moduler plusieurs voies de signalisations cellulaires. En particulier, il a été démontré que la capsid inhibait les transcriptions dépendantes du TGF- β et modulait les réponses biologiques de cette cytokine.

Afin de déterminer si des variants de capsid peuvent avoir acquis des propriétés nouvelles au cours du développement de pathologies chroniques liées au VHC, nous avons analysé la quasi-espèce virale à partir de deux cohortes : des patients ayant développé un carcinome hépatocellulaire (CHC) ou des patients ayant développé une hépatite fibrosante cholestatique (HFC) après transplantation. Pour chaque patient, nous avons défini différents compartiments (foie tumoral, foie non tumoral, foie natif, sérum), et avons analysé la quasi-espèce virale et déterminé le variant majoritaire de capsid pour chaque compartiment. Pour étudier les réponses au TGF- β dans des cellules exprimant ces capsides, les différents variants ont été clonés dans un vecteur eucaryote.

Afin de mener à bien cette étude, différentes techniques de biologie moléculaire ont été utilisées comme la PCR, le clonage, le séquençage, l'analyse phylogénique ainsi que des techniques de biologie cellulaire comme la transfection de plasmide en cellules d'hépatomes (HuH7), l'étude de l'activité promotrice d'un gène à l'aide d'un plasmide reporter couplé à la luciférase, l'immunofluorescence ainsi que des westerns blots permettant d'observer l'expression des protéines de capsid après transfection.

Les résultats obtenus au cours de ce travail, permettent de démontrer l'existence d'une compartimentation significative des variants de capsid chez les patients atteints de CHC et une augmentation de l'hétérogénéité génétique des séquences de capsides tumorales. Dans la cohorte HFC nous n'avons pas observé de regroupement significatif des variants de capsid dans un compartiment particulier et la diversité génétique de la quasi-espèce avant transplantation n'était pas prédictive d'une rechute sévère de la maladie.

Nous avons confirmé la capacité inhibitrice des différents variants de capsides sur les transcriptions dépendantes de Smad3, facteur de transcription spécifique du TGF- β . Pour toutes les capsides de la cohorte HFC l'inhibition des transcriptions Smad3 dépendantes est comparable. Concernant la cohorte CHC, l'inhibition est plus importante lorsque le variant tumoral est exprimé par rapport au variant non tumoral d'un même patient. Néanmoins cette différence est à la limite de la significativité. De plus, l'utilisation de la cohorte CHC a permis de mettre en évidence de façon significative une différence de localisation en fonction de l'origine des capsides.

MOTS-CLÉS : VHC, Core, Quasi-espèces, LDs, TGF- β , Smad.

Liste des abréviations

3'NC : région 3' non codante
5'NC : région 5' non codante
ADN : acide désoxyribonucléique
ALAT : alanine aminotransférase
ARN : acide ribonucléique
ARFP : Alternative reading frame protein
CHC : carcinome hépatocellulaire
HVR : région hypervariable
IRES : Internal Ribosome Entry Site
NS : protéines non structurales du virus de l'hépatite C
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKR : protéine kinase dépendante de l'ARN double brin
Protéine F : F pour Frameshift
RT : reverse transcription
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C
HFC : Hépatite Fibrosante Cholestatique
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
TH : Transplantation Hépatique
ELISA : Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay
RTPCR : Reverse Transcription PCR
HVR1,2 : Hyper Variable Région1,2
ORF : Open Reading Frame (Cadre de Lecture Ouvert)
IRES : Internal Ribosomes Entry Site
SRB-1 : Scavenger Receptor B-1
CLDN-1,-6,-9 : Claudine -1,-6,-9
RE : Reticulum Endoplasmique
kDa : kilo Dalton
aa : acides aminés
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
TGF- β -R1 et TGF- β -R2 : Transforming Growth Factor Receptor 1 et Transforming Growth Factor Receptor 2
JFH1 : Japanese Fulminant Hepatitis
ATP : Adénosine Tri Phosphate
NTP : Nucléoside Tri Phosphate
dNTP : désoxy Nucléoside Tri Phosphate
IFN : Interféron
PegIFN : Interféron Pégylé
PBS : Phosphate Buffer Saline
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBST : Tris Buffer Saline Tween
HRP : Horse Radish Peroxydase
RdRp : Reverse dependant RNA polymérase
SMAD : Similar to Mothers against decapentaplegic
EMT : epithelial to mesenchymal transition
ADRP : Adipocyte Differentiation Related Protein
LD : Lipid Droplet (goutelette lipidique)
dATP, dTTP : désoxy Adénosine Tri Phosphate, désoxy Thymidine Tri Phosphate,
dCTP, dGTP : désoxy Cytosine Tri Phosphate, désoxy Guanosine Tri Phosphate
HDL, LDL, VLDL : High Density Lipoprotéine, Low Density Lipoprotéine, Very Low Density Lipoprotéine

I. Introduction

I.1 L'Hépatite C

I.1.1 Découverte de l'agent responsable de la maladie

Le virus de l'Hépatite C (VHC) est mis en évidence par Qui-Lim Choo en 1989 (1). Cette découverte est le résultat de près de dix années d'efforts et de recherche de l'agent causal des hépatites non A non B qui étaient reconnues comme la cause d'un grand nombre d'hépatites post transfusionnelles (2, 3). Le VHC est le seul représentant du genre *Hepacivirus* (du grec *hepatos*, le foie) au sein de la famille des *Flaviviridae* (du latin *flavos*, jaune) qui compte trois genres : les *Flavivirus*, les *Pestivirus* et les *Hepacivirus*.

I.1.2 Epidémiologie

Le VHC est présent sur l'ensemble de notre planète. Malgré cette répartition ubiquitaire, le taux d'incidence de l'infection à VHC n'est pas le même dans toutes les régions du globe et l'on constate de fortes disparités pour sa prévalence. Ainsi, les pays développés présentent des taux d'incidence faibles de l'ordre de 1 à 1,3% pour les pays de l'Europe de l'Ouest, ou 1,8% pour les Etats-Unis, alors que ces valeurs peuvent être bien plus élevées dans des pays d'Asie du Sud Est comme la Chine ou l'Inde, où certaines populations peuvent présenter des taux de prévalences jusqu'à 87%. Les données pour les pays d'Afrique sont parcellaires, mais ces taux vont de 0% à 51% selon les populations et les zones considérées pour un total d'environ 28 millions de personnes touchées par le VHC sur ce continent. L'Egypte présente un taux de prévalence de 20% environ, mais c'est un cas particulier. Dans ce pays, les campagnes de vaccination de masse anti-schistosomiase, sont responsables de la transmission parentérale du virus (4). Le VHC infecte actuellement de façon chronique environ 160 millions de personnes, soit 2% à 3% de la population mondiale, ce qui pose un réel problème en santé publique. En effet les coûts, liés au traitement de la maladie, aussi bien en phase aiguë que chronique, se chiffreront à plusieurs milliards de dollars rien qu'aux Etats-Unis où une prévision fait état de 184 milliards de dollars pour la période 2010-2019. Car l'infection chronique, par le VHC, est l'un des facteurs de risque majeur, dans le développement de la cirrhose et à terme du carcinome hépatocellulaire (CHC) (5). Le CHC, principale tumeur primitive du foie, se développe en général sur un terrain cirrhotique. Souvent diagnostiqué à un stade tardif, le CHC est de pronostic sombre et représente la première indication de

transplantation hépatique (6). Parmi les complications de la transplantation associées à l'immunosuppression et à la récurrence de l'infection par le VHC, l'hépatite fibrosante cholestatique (HFC) représente une forme fatale d'hépatite virale (7, 8).

I.1.3 Modes de transmission et Facteurs de risques

Les modes de transmissions du VHC ont tous pour origine le sang ou ses produits dérivés. La cause majeure de l'hépatite C, avant l'apparition des tests de dépistage du virus, c'est-à-dire avant 1990, était la transfusion sanguine ou le don d'organe provenant de sujets infectés. Ce risque est quasi inexistant de nos jours avec une incidence actuelle de 1/200000 cas. De nos jours, la voie majeure d'infection par le VHC est l'utilisation d'aiguilles ou de matériels souillés ce qui est le cas lors de l'utilisation de drogue par voie intraveineuse. D'autres pratiques présentant des effractions cutanées peuvent ainsi être à la source de ces transmissions du VHC, comme les actes chirurgicaux, le piercing, le tatouage, l'acupuncture ou les scarifications (9, 10).

On notera d'autres modes de transmission, qui sont relativement minoritaires comme la transmission nosocomiale (11), sexuelle dans le cas des personnes à partenaires multiples, périnatale dans le seul cas où la mère est virémique lors de l'accouchement ou verticale dans le cadre familial (12). Dans 20% des cas, le mécanisme de transmission du virus reste inconnu, soit par une dissimulation du risque par le malade (toxicomanie) soit parce que ce risque est méconnu ou oublié.

I.1.4 Physiopathologie

I.1.4.1 Histoire naturelle de l'infection

L'infection par le VHC affecte le foie. Asymptomatique, dans 80% des cas, l'infection par le VHC, peut prendre un détour plus sombre allant de l'ictère à l'hépatite fulminante dans de très rares cas. Après la phase aiguë, seuls 15% à 20% des malades présentent une hépatite résolutive et guérissent sans aucun traitement. Chez les autres, cette infection conduit ensuite à une hépatite chronique, qui chez 1 patient sur 5 aboutit à une cirrhose, dans les 20 années suivant l'infection. Enfin, entre 3% et 5% des cirrhoses liées au virus de l'hépatite C mènent à un CHC (13) (14). Des facteurs comme l'âge des patients, la consommation excessive d'alcool ou la co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou le virus de l'hépatite B (VHB) peuvent accélérer le développement d'une cirrhose (15).

I.1.4.2 De la phase aiguë au carcinome hépatocellulaire

La phase aiguë de l'hépatite C survient en général 6 à 8 semaines après contact avec le VHC. Elle est le plus souvent asymptomatique, mais peut être ictérique dans 20% des cas. On note une élévation du taux des transaminases hépatiques (ALAT et ASAT) jusqu'à 10 fois, mais inférieur à ceux rencontrés avec les hépatites A et B. Durant la phase aiguë, l'ARN viral est détectable par PCR dans le sérum, 7 à 10 jours après l'exposition au VHC, c'est le premier marqueur de l'infection. Les anticorps anti-VHC, deviennent détectables dans le sérum, entre 20 et 150 jours après l'infection. (9, 15). En présence d'une PCR positive c'est l'apparition des anticorps qui signe le caractère aigu de l'infection (16, 17).

Dans 15% à 20% des cas, la guérison survient de manière spontanée. Elle est définie par l'absence d'ARN du VHC dans le sérum des patients, associée à une normalisation durable des enzymes hépatiques. En revanche le titre des anticorps anti-VHC diminue très lentement avec une persistance d'environ 10 ans (16).

L'infection chronique survient ensuite, elle est le plus souvent asymptomatique. Installée dans le temps, elle est définie par la détection positive d'ARN du VHC par PCR, la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C et une augmentation des transaminases hépatiques, corrélée avec la gravité de l'infection. Les signes cliniques de l'hépatite chronique restent diffus même en cas d'hépatite chronique sévère. Dans ce dernier cas, la progression de la fibrose et le risque d'aggravation vers la cirrhose sont importants.

La cirrhose représente 20% des hépatites chroniques. Histologiquement, c'est une fibrose mutilante entourant des nodules de régénération. Elle présente quatre types de complication, qui sont l'hypertension portale, l'insuffisance hépatique, l'association des deux premières

conduisant à des décompensations ascitiques et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (18).

Le CHC est la plus fréquente tumeur maligne primitive du foie, consécutive à une cirrhose ou à une hépatopathie chronique. On estime son incidence à 564000 nouveaux cas dans le monde et à 5000 à 6000 en France chaque année. C'est le cinquième cancer mondial en terme d'incidence (14). On estime en France, que la mortalité liée au CHC découlant d'une infection par le VHC va augmenter de 150% chez les hommes et 200% chez les femmes d'ici à 2020 (19).

I.1.4.3 Pathologies extra hépatiques

Malgré le tropisme hépatique du virus de l'hépatite C, il existe des pathologies extra hépatiques liées à cette infection. Les plus courantes dont un lien de causalité est avéré avec l'infection due au VHC sont les cryoglobulinémies mixtes et les néphropathies glomérulaires. On notera qu'il semble exister un lien de cause à effet pour les lymphomes malins non-hodgkiniens et la porphyrie cutanée tardive. (20)

I.1.5 Techniques de diagnostic et Dépistage du VHC

Il existe actuellement deux types de tests permettant la mise en évidence de l'infection par le VHC. Les plus anciens sont les tests immunologiques basés sur la présence de marqueurs sériques de l'infection. Les tests moléculaires plus récents permettent la mise en évidence qualitative et ou quantitative et le génotypage de l'ARN du VHC (17).

I.1.5.1 Tests sérologiques

Les tests sérologiques permettant la mise en évidence de l'infection par le VHC sont basés soit sur la détection d'anticorps produits par le patient déterminant une infection passée ou présente, soit sur la détection d'antigènes du virus qui signent une infection en cours. Les anticorps sont mis en évidence grâce à des tests ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay) dans lesquels des protéines recombinantes synthétiques du virus sont fixées sur un support solide et permettent la capture des anticorps. Une réaction colorimétrique enzymatique révèle la présence des anticorps. La détection sérique de certains antigènes viraux est également réalisée grâce à une technique ELISA, ici ce sont les anticorps qui sont fixés sur le support solide afin de capturer les antigènes, la révélation de ces antigènes se fait également grâce à une réaction colorimétrique enzymatique. On peut ainsi mettre en évidence la capside du VHC, qui apparaît après l'ARN viral mais bien avant la séroconversion (21).

I.1.5.2 Tests moléculaires

Ils permettent la mise en évidence de l'ARN viral du VHC.

Il existe différentes techniques de mise en évidence des ARN viraux, la RT-PCR, quantitative ou non, permet la mise en évidence de ces ARN viraux et le suivi dans le temps de la charge virale du patient. La technique de l'ARN ramifié (bDNA) permet l'amplification et la quantification de la charge virale (22). Une autre technique le TMA (Transcription Mediated Amplification), qui est l'amplification du signal médié par la transcription, permet d'amplifier le signal par synthèse/transcription d'ARN grâce à l'élongation avec des primers spécifiques du VHC. Ces ARN sont ensuite quantifiés, cette technique est très sensible, car elle permet la détection d'une charge virale faible (5 à 10 UI/ml). Enfin le génotypage, est essentiel pour la mise en place d'un traitement thérapeutique, car la réponse au traitement est dépendante de la charge virale pré thérapeutique et du génotype. Deux techniques sont disponibles, la première utilise des amplicons obtenus par RT-PCR hybridés contre des sondes fixées sur bandelettes de nitrocellulose (VERSANT VHC Génotype Assay (LIPA)), la deuxième s'appuie sur le séquençage direct de différentes régions du génome viral et leur comparaisons vis à vis des banques de données moléculaires.

I.2 Le virus de l'Hépatite C

Le VHC est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9600 pb, intégré dans une capside icosaédrique d'environ 60 nm enveloppée. Son génome présente une phase de lecture ouverte unique, codant une polyprotéine d'environ 3200 aminoacides, qui est flanquée en 5' et en 3' de deux régions non codantes très structurées. La traduction de cette protéine est initiée par l'IRES (Internal Ribosome Entry Site), site interne d'entrée du ribosome, présent dans la partie 5' non codante. La polyprotéine obtenue par la traduction de ce cadre de lecture unique, est ensuite clivée par les protéases cellulaires et virales et donne naissance à dix protéines.

I.2.1 Variabilité génomique du VHC : du génotype à la quasi-espèce

Le VHC présente une grande variabilité génétique, caractérisée par sept génotypes majeurs, de nombreux sous types et la présence de la quasi-espèce virale chez les sujets porteurs.

La grande variabilité de ce virus est due à l'absence de système de correction des erreurs de la polymérase virale lors de l'étape de réplication du brin d'ARN. En effet, la polymérase du VHC, est dénuée d'activité 3'-5' exonucléase correctrice. Cette propriété est commune à tous les virus à ARN. Le taux de mutation est environ de 10^{-3} à 10^{-5} erreur par paire de bases copiée, ce qui constitue pour le VHC environ une erreur par génome complet. Ce phénomène

couplé à une production virale massive de l'ordre de 10^{12} virions produits par jour, génère un grand nombre de mutants. Une grande partie de ces mutants sont défectifs, c'est-à-dire incapables de conduire à la production de virions infectieux, car la plupart de ces mutations intervenues au hasard sont létales. Les mutations non-délétères s'accumulent alors au cours des répliquations successives, conférants ou non, à ces variants des avantages sélectifs. Ces mutations doivent néanmoins respecter la structure de l'ARN et ou des protéines virales, ceci par nécessité de conserver leur fonctionnalité, permettant ainsi la survie des virions néo synthétisés (23).

Cette production permanente de nouveaux variants permet et semble expliquer l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte ainsi que sa persistance *in vivo*. Elle permet l'établissement d'une distribution de population virale chez tout nouvel individu infecté, appelée la quasi-espèce virale.

Cette variabilité de population virale est différemment représentée sur l'ensemble du génome. Le séquençage du génome du VHC a permis de mettre en évidence certaines régions très conservées, les régions non codantes, 5'NC et 3'NC, et la région codant pour la protéine de capsid. Au contraire, les régions codant pour les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2 sont beaucoup plus variables et en particulier les régions HVR1 et HVR2 (Hyper Variable Region) de E2 sont les plus variables de tout le génome du VHC (24).

Cette hétérogénéité génétique se traduit dans la nomenclature actuelle par l'existence en sept génotypes majeurs, eux-mêmes sub-divisés en de nombreux sous-types. Cette nomenclature basée sur la similarité de séquence nucléotidique, date de 1994 (25). Les génotypes sont constitués de deux caractères, le premier concerne le type, il est identifié par un chiffre arabe (1 à 7), le deuxième, le sous-type, il est représenté par une lettre minuscule (1a, 1b, 1c, etc.). Le génotype 1a correspond à la séquence clonée par *Choo et al.* en 1991 (26). La numérotation est ensuite réalisée dans l'ordre de découverte. La variabilité des différentes régions du génome n'étant pas la même, il a été défini que des génomes complets présentant de 64% à 70% d'homologie de séquences seraient regroupés en génotype, de 70% à 80% d'identité en sous-type et au-delà de 90% correspondraient alors à un isolat particulier. Enfin une homologie supérieure à 98%, définit les variants des quasi-espèces virales présentes chez un individu (24).

Donc pour chaque patient, infecté par une souche virale, sera défini un génotype, composé d'un type et d'un sous-type particulier, pour lequel on observera une population virale hétérogène composée d'un mélange en équilibre instable et en permanente évolution, de variants naturels génétiquement distincts bien qu'apparentés à cette souche, la quasi-espèce. Chez ce même patient on retrouvera en fonction du temps, et du compartiment cellulaire considéré, une répartition des différents variants viraux (27, 28).

Comme pour la répartition de la quasi-espèce au sein de chaque individu, la répartition mondiale des différents génotypes est loin d'être uniforme. Les génotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 2c et 3a, sont présents dans les pays industrialisés, avec une prédominance 1a, 1b en Europe et aux

USA, le génotype 3a, présente une prévalence plus faible aux Etats-unis qu'en Europe, on le retrouve principalement chez les utilisateurs de drogues intraveineuses en Europe. Le génotype 1b présente une prévalence proche des 100% au Japon où seuls quelques rares génotypes 1a et 3a sont retrouvés. Le génotype 4 est surtout représenté au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, le génotype 5 uniquement en Afrique du Sud et enfin le génotype 6 surtout en Asie. La littérature ne fournit pas d'indication quant à la prévalence du nouveau génotype 7 (Numéro d'Accession EMBL : EF108306), cette souche isolée au Canada provient d'un émigrant originaire de la république du Congo.

Ce polymorphisme génétique est aussi retrouvé au niveau de la pathologie induite par le virus. Bien que le génotype ne semble pas influencer la pathologie viro-induite, (à l'exception de la stéatose hépatocytaire qui est directement associée à l'infection par un génotype 3 (29)) la connaissance du génotype viral infectant l'hôte est le facteur primordial pour l'application d'un traitement thérapeutique.

I.2.2 Organisation génomique du VHC

L'ARN viral monocaténaire de polarité positive se subdivise en trois régions distinctes que sont la région 5'NC, la phase de lecture ouverte (ORF) et enfin la région 3'NC.

I.2.2.1 La région 5' non codante

La région 5' non codante, constituée de 341 à 344 nucléotides (nt), est structurée en quatre domaines tige boucle (30). Cette région est très organisée et hautement conservée. En effet c'est la seule partie du génome du VHC qui présente des similarités avec d'autres génomes viraux connus, elle est par exemple de 50% avec les *Pestivirus* animaux (représentants phylogénétiquement les plus proches du VHC), cette similarité atteint au minimum 90% pour les souches de VHC entre elles. Cette région présente des structures secondaires et tertiaires complexes. Elle permet la fixation de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'IRES (Internal Ribosome Entry Site) rendant ainsi possible l'initiation de la traduction (31) de manière coiffe indépendante. Le codon d'initiation de la traduction fait partie intégrante de l'IRES contrairement aux *Picornaviridae*. La partie 3' terminale de l'IRES n'est à ce jour toujours pas définie, on la situerait en dehors de la région 5' NC au début de la capsidie entre les nucléotides 12 et 30 (32). Enfin la région 5' NC porte le signal d'encapsidation nécessaire à la formation de la nucléocapside.

I.2.2.2 La phase ouverte de lecture

La phase de lecture ouverte est de taille variable (9024 à 9111 nt) selon les isolats. Cette ORF code pour une polyprotéine qui est clivée co- et post-traductionnellement en dix protéines, dont la séquence est la suivante NH₂-Capside-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Deux types de protéines sont alors produites, les protéines structurales : la Capside (C), les deux glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) et la protéine P7, qui est une viroporine. Ces protéines sont libérées à partir de la polyprotéine virale par les protéases cellulaires peptidases et peptide peptidase. Les trois protéines structurales et la protéine p7 sont situées en N'terminal, précèdent les protéines non structurales qui assurent les fonctions enzymatiques utiles au cycle viral (33).

Donc, en aval des gènes codant pour les protéines structurales dans le sens 5'-3' on trouve les gènes codant pour les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B qui sont respectivement, une protéine hydrophobe attachée à la membrane cellulaire (NS2), une protéase virale (NS3), une protéine trans-membranaire co-facteur de NS3 (NS4A), une autre protéine trans-membranaire responsable du réseau membranaire (NS4B), une phosphoprotéine virale (NS5A), et enfin la polymérase virale (NS5B). Après libération des protéines structurales de la polyprotéine, c'est la protéase virale qui permet la production des différentes protéines non structurales. Une onzième protéine est décrite, appelée protéine F (ARFP, Alternate Reading Frame Protein), elle est le résultat du décalage du cadre de lecture de la région codant pour la capsid.

I.2.2.3 La région 3' non codante

La région 3' non codante est le site d'initiation de la synthèse du brin négatif, qui constitue l'intermédiaire de la réplication. D'une longueur variable de 200 à 235 nt, cette région est structurée de la façon suivante en allant dans le sens 5'-3' : elle est constituée d'une région non traduite directement en aval de la protéine NS5B de longueur comprise entre 20 nt et 70 nt dont la composition est variable selon les isolats mais fortement conservée de manière intra génotypique, puis d'une région polyuridylée de longueur variable (30 à 150 pb) et enfin d'une séquence de 98 nucléotides hautement conservée appelée région X, repliée en 3 tiges boucles successives. Ces deux dernières régions semblent jouer un rôle dans l'infectivité du VHC, comme le montrerait un modèle d'infection sur des chimpanzés (34, 35).

I.2.2.4 Modèles d'étude

L'étude du VHC a longtemps souffert de l'absence d'un système cellulaire qui permette la réalisation d'un cycle réplcatif cellulaire efficace et complet *in vitro*, autorisant l'étude de la structure et des fonctions des différentes protéines virales. Ce n'est qu'en 1999 qu'un tel système a été mis au point par l'équipe du Dr Bartenschlager (DKFZ, Heidelberg,

Allemagne). Le réplicon subgénomique du VHC (36) est une construction synthétique exprimant les protéines virales qui mime une cellule infectée par le VHC. Dans ce cas, seules les protéines non structurales sont exprimées, ne mettant en évidence le rôle des protéines NS2 à NS5B, occultant alors la morphogenèse virale et ne permettant pas la production de particules virales. En effet, en lieu et place des protéines structurales se trouve une séquence de marqueur de sélection. Par la suite, en 2005, un génome complet a été cloné dans cette construction limitée initialement aux protéines non structurales.

La souche virale JFH1 (Japanese Fulminant Hepatitis) de génotype 2a, provenant d'une hépatite fulminante a montré de fortes capacités d'adaptation dans les cultures cellulaires de la lignée Huh7 (37). En effet, cette souche présente un haut niveau de réplication et l'avantage de produire des virions infectieux, ouvrant ainsi la voie à l'étude des différentes étapes du cycle infectieux que sont l'entrée du virus, la réplication du génome et finalement la morphogenèse.

I.2.2.5 Cycle viral

La particule infectieuse se lie aux récepteurs cellulaires *via* les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2. Les récepteurs cellulaires impliqués dans cette reconnaissance sont les suivants :

- le récepteur CD81, appartient à la famille des tétraspanines (38). Ses fonctions sont multiples, il est exprimé de manière ubiquitaire. Il est impliqué dans des phénomènes d'adhésion, d'activation, prolifération et différenciation cellulaire. Après l'étape de fixation des particules virales à la membrane cellulaire, il interviendrait dans l'entrée du VHC (39, 40).
- SR-BI (Human Scavenger Receptor class B type 1) est une glycoprotéine exprimée principalement dans le foie et dans les tissus synthétisant les stéroïdes. Récepteur de nombreux ligands, il lie notamment des lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL) (41). La liaison de SR-BI au VHC a lieu par la partie HVR1 de la glycoprotéine E2. Comme CD81, il interviendrait après l'attachement du virus à la cellule (42).
- CLDN-1 est une protéine de la famille des claudines impliquée dans l'entrée du VHC (43). Elle est exprimée de façon prédominante dans le foie, où elle participe à la formation des jonctions serrées. Elle interviendrait après les SR-BI et CD81. Lors de l'infection au VHC, la perméabilité cellulaire est fonction de la densité de la distribution des CLDN-1 au niveau des jonctions serrées. Lors de l'infection de lignées cellulaires hépatocytaires Huh-7 par le VHC on observe une baisse de l'expression de CLDN-1, ce qui prévient ainsi les surinfections (44). Les CLDN-6 et 9 pourraient également participer à l'entrée du VHC (45). En effet les CLDN-1, CLDN-6 et CLDN-9 possèdent une boucle extracellulaire, EL1, qui est une région très conservée et qui semble impliquée dans l'entrée du VHC (43).
- les occludines proches des claudines sont les composants des jonctions serrées. Également impliquées dans l'entrée du virus (44), elles interagiraient avec la glycoprotéine E2.

L'infection par le VHC diminue le nombre des jonctions serrées qui permettent le maintien de la polarité de l'hépatocyte ce qui peut être à l'origine de désordres cholestatiques.

Enfin une étude récente apporte des éléments indiquant que le récepteur à EGF (Epidermal Growth Factor), jouerait un rôle de cofacteur lors du processus d'entrée du virus dans la cellule (46, 47).

Une fois que la reconnaissance entre la particule virale et son récepteur est établie, il y a fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Cette fusion est dépendante du pH. Elle a lieu à pH acide, ce qui induit un changement de conformation de l'enveloppe virale, une décapsidation de la particule virale, permettant ainsi la libération de l'ARN positif du génome viral. Cet ARN (+) est ensuite traduit grâce à la machinerie cellulaire (ribosomes, protéines cellulaires) au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les protéines virales synthétisées alors sont nécessaires à la réplication du virus. Elles sont associées à la membrane du RE à proximité des gouttelettes lipidiques. L'ARN (+) sert alors de brin matriciel pour la synthèse de l'intermédiaire de réplication, l'ARN (-), qui va permettre la néo synthèse d'un grand nombre de brins positifs. Après internalisation des brins positifs dans les capsides néoformées, les futures particules virales composées des protéines de capside et de E1 et E2 bourgeonnent à partir du RE. Le relargage extracellulaire des particules virales s'opère ensuite grâce à des vésicules d'exocytose vers la membrane cellulaire (48).

I.2.3 Structure et fonction des protéines virales

I.2.3.1 Les protéines structurales

I.2.3.1.1 La protéine de capsid

C'est la première protéine produite à partir de l'extrémité amino-terminale de la polyprotéine virale. Elle est très conservée d'une souche virale à l'autre et fortement antigénique, son rôle premier est de former la nucléocapside virale.

Durant la genèse de la protéine de capsid du VHC, la signal peptidase cellulaire de l'hôte est responsable du clivage entre la capsid et E1 à l'extrémité C-terminale de la protéine de capsid conduisant à la production de la forme immature de cette phosphoprotéine basique de 191 aa et de 21 kDa (kiloDalton) (49). Cette protéine immature subit un second clivage protéolytique, du segment hydrophobe C-terminal au niveau de l'acide aminé 173 par l'action de la signal peptide peptidase, qui aboutit à la formation d'une forme courte de 19 kDa qui correspond à la forme mature de la protéine de capsid (33, 50). C'est cette dernière forme qui est majoritairement exprimée dans les cellules de mammifères. Elle est le constituant principal de la nucléocapside virale, grâce à ses capacités de dimérisation, de multimérisation et de son interaction avec l'ARN viral du VHC (51, 52).

En effet, cette protéine très basique est capable de se multimériser et de former des hétérodimères en association avec la glycoprotéine d'enveloppe E1. Cette multimérisation *in vivo* et *in vitro* est dictée par la présence d'acides aminés à des positions bien définies sur la séquence. Pour permettre une homodimérisation, les résidus compris entre 36Leu et 91Leu, ainsi que ceux entre 82Pro et 102Gly sont nécessaires. Les résidus situés entre les positions 122Val et 173Cys sont eux essentiels pour la formation de multimères. Ces complexes permettront ensuite la formation de la nucléocapside virale (53, 54). La structure de la protéine de capsid immature (p21), peut être subdivisée en trois domaines distincts. Le domaine amino-terminal D1, formant une région hydrophile basique d'une longueur de 120 aa (acides aminés) est suivi par le domaine hydrophobe D2 qui est constitué de la portion couvrant les aa de 120 à 175, et enfin le domaine D3 formé par les aa de 175 à 191 (55). Ce dernier renferme la séquence « peptide signal » qui est clivé par la signal peptide peptidase (SPP), lors de la maturation de la protéine capsid. Le domaine D2 devient alors l'extrémité carboxy terminale de la forme mature (p19) de la protéine de capsid. Il présente deux hélices alpha amphipatiques HI et HII séparées par une boucle hydrophobe HL qui interviennent dans la conformation et la stabilisation de D1. L'attachement de la protéine de capsid aux gouttelettes lipidiques est médié par cette structure HI-HL-HII (56). Le domaine D1, quand à lui est impliqué dans les liaisons protéine-protéine nécessaires à la formation de la capsid

virale. Il est également capable de fixer l'ARN et est impliqué dans l'encapsidation du génome viral. Un signal de localisation nucléaire (NLS) a également été identifié dans ce domaine (57, 58).

Les autres fonctions de la protéine de capsidie seront développées dans un paragraphe particulier.

1.2.3.1.2 La protéine ARFP

La protéine ARFP, pour "Alternate Reading Frame Protein" ou protéine F pour "Frameshift" ou encore Core+1 protéine, est une protéine produite par le virus de l'hépatite C grâce à une ORF superposée à celle de la protéine de capsidie en +1/-2. La taille de cette protéine est génotype dépendante, de 126 à 162 aa (162 aa pour le génotype 1a, 144 aa pour 1b, 126 aa pour 2a et entre 126 aa et 165 aa pour la plupart des séquences des autres génotypes). Différents codons de départ sont proposés pour l'initiation de la traduction interne, dont les codons 11 et 85/87, conduisant à la production de protéines de longueurs différentes. Le rôle de cette protéine dans la pathogenèse du VHC n'est pas clairement défini, mais elle n'est pas indispensable dans le cycle de réplication viral lors de l'utilisation du réplicon JFH1. On la retrouve localisée dans le cytoplasme cellulaire, dans l'aire périnucléaire, et elle co-localise avec le RE (59). Elle est également retrouvée au niveau mitochondrial (60). Un de ses domaines (aa 72 à 115) présente des similarités avec le domaine transmembranaire de ABC1 (ATP-binding cassette transporteur) dont le rôle est la translocation du cholestérol et des phospholipides en dehors des macrophages. (61).

1.2.3.1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppes E1 (30 à 35 kDa) et E2 (70 à 72 kDa) sont libérées de la polyprotéine virale grâce à l'action de la signal peptidase de l'hôte. Ces protéines de structure rentrant dans la composition de l'enveloppe virale sont intensément glycosylées, avec respectivement au moins 6 à 11 sites possibles pour E1 et E2. Comme les protéines transmembranaires de type I, elles comportent un ectodomaine N-terminal et une région hydrophobe C-terminale d'ancrage dans le RE. Elles sont principalement localisées dans la lumière de ce dernier, où elles forment des hétérodimères qui sont résistants aux protéinases. Elles forment également des agrégats dans lesquels elles sont assemblées par un pont disulfure. E2 porte dans sa partie N-terminale deux régions hypervariables appelées HVR1 et HVR2. La variabilité de la séquence E2 HVR1 fait partie intégrante de la stratégie d'évasion virale grâce à laquelle le VHC échappe au système immunitaire de l'hôte en potentialisant la production de la "quasi-espèce" virale. En effet, la région E2 HVR1 est un des principaux épitopes contre lequel sont dirigés les anticorps neutralisants de l'hôte. En dépit de la

variabilité de E2 HVR1, les propriétés physicochimiques des différents résidus qui la composent ainsi que sa conformation sont très conservés entre les différents génotypes. E2 semble interagir avec différents récepteurs du VHC comme la tetraspanine CD81, le scavenger receptor de type 1 SRB1, et certaines lectines comme DC-SIGN ou L-SIGN. (34, 62)

1.2.3.1.4 La protéine p7

La protéine p7 du VHC située entre E2 et NS2 est un produit de clivage de la poly-protéine virale par la signal peptidase de l'hôte. p7 est une protéine de 63 aa qui possède deux domaines trans-membranaires séparés par une boucle cytoplasmique. p7 est localisé au niveau du RE (63). Le rôle de cette viroporine n'est pas encore clairement établi mais l'oligomérisation structurée probablement en hexamères et en heptamères de cette protéine permet la formation de canaux ou de pores augmentant la perméabilité cellulaire à différents ions ou molécules de petites tailles. De plus p7 est indispensable à l'infection par le VHC, mais pas nécessaire à la réplication virale. Cette protéine est impliquée dans les dernières étapes d'assemblage et la libération du virus. C'est une cible toute indiquée pour les nouveaux traitements antiviraux, en effet l'activité du canal ionique de p7 est inhibée par deux d'entre eux, l'amantadine et la rimantadine (64, 65).

I.2.3.2 Les protéines non structurales

I.2.3.2.1 La protéine NS2

NS2 est une protéine transmembranaire de 217 aa et de 23 kDa associée au RE par son domaine N-terminal hydrophobe. Elle forme avec NS3 une auto-protéase aboutissant à la libération des protéines non structurales NS2 et NS3 après clivage de la polyprotéine virale. L'établissement de la structure cristalline de NS2 a permis de déterminer que c'est une protéase à cystéine. NS2 par elle-même ne semble pas directement impliquée dans la réplication, mais le clivage NS2/3 est nécessaire à la réplication *in vivo*. Elle est également nécessaire pour l'assemblage de la nucléocapside : en se fixant à E2 et p7, elle permet la libération des glycoprotéines d'enveloppes. Protéine multifonctionnelle, NS2 est également impliquée dans l'hyperphosphorylation de NS5A (passage de la forme p56 à p58). Ainsi la région amino-terminale de NS2 inhibe les promoteurs de certains gènes cellulaires comme celui de l'IFN-beta (Interferon-beta). Elle a été associée à une perturbation de l'homéostasie des lipides. Enfin, cette protéine inhiberait la prolifération cellulaire *in vitro* et modifierait le cycle cellulaire afin de permettre la mise en place d'un environnement cytosolique avantageux pour la réplication virale. Cette protéase ne partageant aucune séquence homologue avec des protéases connues, est une cible potentielle pour la mise en place de traitement dirigé contre le VHC (62, 66).

I.2.3.2.2 La protéine NS3

La protéine NS3 est libérée de la polyprotéine virale par l'activité auto protéase de NS2/3. C'est une protéine hydrophile de 70 kDa présentant deux domaines actifs. Dans son tiers N-terminal on trouve un domaine protéase puis dans les deux tiers C-terminaux restant un domaine NTPase/hélicase. Elle est identique par sa structure et ses fonctions aux autres NS3 retrouvées chez les *Flaviviridae*.

L'activité hélicase de NS3 permet le débobinage de l'ARN et de l'ADN double brin ainsi que des hétéro duplex ARN/ADN dans le sens 3'-5'. Ce débobinage a lieu en présence d'ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} et d'ATP (Adénosine Tri Phosphate). L'activité hélicase de NS3, conférée par son domaine C- terminal, sert à séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN viral au moment de la réplication. Elle permet également l'accès de l'ARN polymérase virale NS5B, aux structures très repliées, comme l'IRES en 5'NC et la région X de l'extrémité 3'NC, abolissant ainsi les structures secondaires des ARN positifs, ce qui favorise la traduction des protéines virales.

L'activité sérine protéase de NS3 permet le clivage des protéines situées en aval sur la polyprotéine virale. La structure de NS3 la rapproche de la superfamille des protéinases trypsines, elle est proche des chymotrypsines. Elle permet le clivage au niveau des jonctions protéiques NS3/4A (en cis) et NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B (en trans). Ces clivages ne peuvent avoir lieu sans la formation d'un hétérodimère stable avec le cofacteur NS4A en présence de zinc (67). La sérine protéase NS3 semble également capable d'interagir avec des protéines cellulaires de l'hôte au cours de l'infection. La portion hélicase de NS3 est impliquée dans la régulation de la transduction du signal par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) ce qui semble pouvoir influencer la survie et la prolifération de sa cellule hôte (34, 68). Des inhibiteurs spécifiques de la protéase NS3-NS4A sont en cours de développement.

1.2.3.2.3 La protéine NS4A

NS4A est une protéine hydrophobe de 54 aa et de 8kDa présentant trois fonctions. NS4A est le cofacteur essentiel de la sérine protéase NS3 pour tous les clivages réalisés par cette dernière à l'exception du clivage NS5A/5B. Elle permet l'ancrage de NS3 et des autres protéines du complexe de réplication à la membrane cellulaire, et enfin elle régule la phosphorylation de NS5A (68).

1.2.3.2.4 La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa et 270 aa. Cette petite protéine est localisée dans la paroi du RE où elle occupe une position transmembranaire orientée vers le cytoplasme. Son expression ainsi que celle de la polyprotéine virale aboutit à la formation d'une structure membranaire multi vésiculaire appelée « membranous web » (réseau membranaire) émanant du RE. En effet l'expression de cette protéine est suffisante pour provoquer la formation de vésicules membranaires qui génèreront ce réseau membranaire. C'est dans cette structure particulière qu'a lieu la réplication virale. On y retrouve ainsi, NS4B associée aux autres protéines non structurales, au sein du complexe de réplication. NS4B semble pouvoir lier l'ARN (69). De plus il a été suggéré que NS4B pourrait avoir des propriétés transformantes *in vitro* (70).

1.2.3.2.5 La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine hydrophile de 447 aa, liée aux membranes cellulaires. On la retrouve sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 kDa et 58 kDa, qui

correspondent à leur degré de phosphorylation, qui sont régulées par NS4A. NS5A est associée au sein du complexe de réplication aux autres protéines non structurales. Ce complexe est localisé à proximité des membranes du réticulum endoplasmique. La fonction de NS5A au sein de ce complexe reste inconnue. Elle participe probablement à la régulation de l'activité de l'ARN polymérase, NS5B, dépendante de l'ARN.

NS5A possède de nombreuses propriétés qui pourraient participer à la pathogénie de l'infection, dont la carcinogenèse induite par le virus. En effet, elle entraîne une stéatose dans un modèle murin transgénique. De nombreuses interactions entre NS5A et des protéines cellulaires de l'hôte ont également été rapportées, dont son rôle dans la résistance à l'interféron alpha au cours de l'infection, ou du traitement anti-viral en interagissant avec PKR (RNA-activated protein kinase), en perturbant la dimérisation de ce dernier. De plus NS5A semble moduler PI4KIII α (phosphatidylinositol 4-kinase α) pour le compte de la réplication virale du VHC et la production de virions (71, 72).

1.2.3.2.6 La protéine NS5B

NS5B est une phosphoprotéine de 68 kDa localisée à proximité des membranes que l'on retrouve au niveau du RE et des membranes qui en dérivent. Elle interagit directement avec NS3 et NS4A au sein du complexe de réplication où l'on retrouve également NS4B et NS5A. Comme les polymérases, elle présente une structure en main droite classique, avec des « doigts » et un « pouce » définissant une « paume ». Elle contient des motifs d'acides aminés conservés (GDD- Glycine/Acide aspartique/Acide aspartique) caractéristiques des ARN polymérases dépendantes de l'ARN (RdRp) et son activité polymérase a été démontrée *in vitro*. Son interaction avec l'extrémité 3' de l'ARN viral aboutit à la copie du génome complet (brin négatif à partir d'un brin positif, et inversement). Son rôle crucial dans le cycle viral la désigne comme une cible de choix pour les inhibiteurs spécifiques de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN du VHC, qui sont en cours de développement (34, 62).

I.2.4 Traitements et thérapeutiques

Il n'existe à ce jour aucun vaccin permettant de prévenir contre une infection par le VHC, contrairement au VHB. Donc, l'objectif principal du traitement de l'hépatite virale C est le blocage de la réplication virale et l'élimination du virus. L'évaluation de cet objectif ne peut se faire qu'à long terme (10 à 30 ans) et sa mesure est relativement difficile. En effet, l'évolution de l'hépatite diffère d'un malade à l'autre aussi bien en terme de rapidité que de sévérité et des facteurs associés que sont entre autres, l'alcool, l'âge ou la surcharge pondérale. L'arrêt de l'infection chronique est presque toujours accompagné d'un arrêt voir d'une régression de la fibrose hépatique. Ainsi, on constatera à court terme (48 à 72 semaines

après le début du traitement) l'élimination du VHC par RT-PCR, accompagnée d'une normalisation de la morbidité et de la mortalité liée à l'hépatite, ceci validé par différentes études épidémiologiques. Donc, le but du traitement contre l'hépatite virale C est l'obtention d'une réponse virologique soutenue à 24 semaines après l'initiation du traitement, qui se caractérise par la "négativation" de la charge virale C. Ce critère est affiné par la réponse virologique précoce, qui correspond à une baisse de 2log de la charge virale C après trois mois de traitement. En effet, la réponse virologique précoce est prédictive d'une réponse virologique tardive.

Actuellement, le traitement de l'hépatite virale C est basé sur l'utilisation de l'interféron dans sa forme simple (IFN-alpha 2) ou couplé à du poly-éthylène glycol (PegIFN-alpha). On trouve ainsi deux molécules présentant des effets antiviraux comparables, l'interferon-alpha-2a et l'interferon-alpha-2b (73).

L'interféron est associé en bithérapie à un analogue nucléosidique, la ribavirine, qui présente des propriétés antivirales vis à vis de nombreux virus. La ribavirine utilisée en monothérapie, montre une activité directe modérée et transitoire par rapport au VHC, mais son utilisation est justifiée par son effet synergique en bithérapie avec l'IFN (Interferon) (74) dans la prévention de la rechute virologique. Trois hypothèses sont avancées pour expliquer son mode d'action dans le traitement de l'hépatite C. La ribavirine stimulerait la production d'IFN-gamma par les lymphocytes Th1, elle bloquerait le mécanisme de réplication virale en inhibant l'IMP déshydrogénase (Inosine Monophosphate déshydrogénase), enfin elle pourrait également induire des mutations létales pour le VHC. En effet cet analogue nucléosidique présente un effet mutagène lors de son incorporation dans le génome du VHC.

La bithérapie IFN/Ribavirine est d'efficacité variable selon le génotype. En effet, les souches virales de génotype 1 répondent à 50% au traitement contrairement aux génotypes 2 et 3 où l'on atteint 80% de réponse.

C'est pourquoi de nouveaux traitements de l'hépatite C sont actuellement à l'essai, ce sont des traitements utilisant des inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A, qui permet la production des protéines non structurales du virus à partir de la polyprotéine virale. L'inhibition de cette protéase conduit à l'arrêt du cycle viral. L'un de ces inhibiteurs de protéase est le Telaprevir. On retrouve également des anti-polymérase qui vont inhiber l'action de NS5b, et bloquer ainsi la réplication virale, comme la Valopicitabine (75). On va également trouver des anti-hélicases dirigées contre NS3 (76).

Compte tenu des phénomènes de résistance déjà bien observés avec le même type de traitements pour le VHB ou le VIH, l'utilisation de ces molécules imposera sûrement à l'avenir, l'utilisation de combinaisons de ces antiviraux afin d'échapper à cet écueil (77). La bithérapie IFN-peg/Ribavirine garde donc tout son intérêt à l'heure actuelle (78).

I.3 La protéine de capsid du VHC.

Parallèlement à son rôle de structure dans la nucléocapside, la protéine de capsid du VHC est impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires. Ainsi, des observations basées sur ses propriétés physicochimiques (présence à l'extrémité N terminale de la protéine de capsid de site fixation de l'ADN, de sites de phosphorylation, d'une séquence signal de localisation nucléaire (NLS)), ainsi que sa localisation cytoplasmique suggère qu'elle pourrait moduler l'expression de gènes cellulaires et ainsi posséder de nombreuses fonctions. En effet, la capsid semble interagir avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire comme le montrent différents travaux. Ainsi en perturbant la voie du TNF α (Tumor Necrosis Factor *alpha*) *in vitro*, elle inhibe l'apoptose induite par ce dernier (79, 80), elle semble également permettre l'activation de certaines kinases comme par exemple PKR (RNA-activated protein kinase) (81). De plus, son attachement à la protéine p53 entraîne une régulation des voies impliquant ce facteur de transcription, conduisant ainsi respectivement à des effets pro ou anti apoptotiques (82, 83).

De plus, différents travaux montrent son implication dans le phénomène de stéatose hépatique (29, 84) ainsi que dans les phénomènes de fibrose hépatique par le biais de l'activation de péricytes particuliers, les cellules étoilées (85). En effet, la construction de mutants de la capsid présentant des délétions dans le domaine D2 montre un défaut d'association aux membranes du RE, ainsi qu'un déficit de morphogénèse des pseudos particules virales et d'association aux gouttelettes lipidiques. Ce domaine est très impliqué dans le métabolisme lipidique car la mutation de la Tyr 164 par un résidu Phe montre une accumulation importante de la quantité de gouttelettes lipidiques dans les cellules exprimant ce mutant (29). Ce modèle cellulaire mime ainsi le processus de stéatose viro-induite signant donc l'implication de la protéine de capsid du VHC dans la stéatose hépatique.

Il a également été observé que la protéine de capsid, modifie la distribution intracellulaire des gouttelettes lipidiques en les relocalisant à la périphérie du noyau cellulaire. Cette propriété permettrait de localiser ces gouttelettes lipidiques au niveau des sites de synthèse virale où seraient présents des génomes viraux néo-synthétisés, les protéines non structurales, permettant ainsi la formation de la nucléocapsid et l'emballage de l'ARN viral à partir des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) contenus dans ces gouttelettes lipidiques. (86). Cette relocalisation des gouttelettes lipidiques s'accompagne d'une perturbation de la structure microtubulaire de la cellule. En effet, il a été montré que la protéine de capsid interagissait directement avec les microtubules en augmentant leur polymérisation et utiliserait le moteur kinesine/dynéine pour permettre son déplacement le long des microtubules (87).

Il semblerait également qu'elle soit directement impliquée dans la pathologie viro-induite conduisant au CHC (Carcinome Hépatocellulaire) car dans un modèle transgénique murin exprimant la protéine de capsid de façon constitutive on observe une perturbation du système immunitaire, le développement de la stéatose, des dommages hépatiques et parfois le

développement d'un CHC (84, 88). De plus, un autre modèle murin exprimant uniquement les protéines structurales ou un génome complet montre le développement de la stéatose et une augmentation du risque de CHC pour la lignée exprimant le génome complet (89).

La protéine de capsid semble également associée au phénomène de TEM (Transition Epithelium/Mésenchyme) dans la lignée cellulaire de cholangiocarcinome, QBC939 (90) ainsi que dans des hépatocytes en culture primaire (91). Enfin, la protéine de capsid interagit également avec la voie du TGF- β (Transforming Growth Factor β), cet aspect particulier sera développé dans le paragraphe consacré au TGF- β .

I.4 Le TGF- β

Le Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) est une cytokine multifonctionnelle, qui joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, le développement de la matrice extracellulaire. Cette cytokine appartient à la superfamille du TGF- β composée par les inhibines, les BMPs (Bone Morphogenetic proteins) et les activines. Structuellement similaires, ces cytokines sont présentes chez la plupart des espèces, tant chez les insectes que chez les mammifères. Trois isoformes du TGF- β ont été décrites (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3). Ces isoformes jouent des rôles particuliers dans l'embryogenèse et ne sont pas redondantes puisque l'invalidation de TGF- β 2 ou 3 est létale et le KO de 1 provoque la mort des souris quelques jours après leur naissance.

Le TGF- β est sécrété sous forme d'un complexe latent (92), le LLC (Large Latency Complex) composé de la forme active associée à la LAP (Latency Associated Peptide) et à la LTBP (Latent TGF Binding Protein). La LTBP possède des domaines qui interagissent avec la matrice extracellulaire qui va stocker cette forme inactive du TGF- β (93). La plasmine, certaines métalloprotéases, la thrombospondine1 ainsi que différentes intégrines sont des agents impliqués dans cette activation qui se déroule à la surface des cellules cibles. Cette activation se produit soit par protéolyse, soit par un changement conformationnel induit par traction. L'activation du TGF- β latent est d'une importance capitale dans les effets biologiques de cette cytokine puisque le TGF- β requiert cette maturation pour se fixer sur son récepteur et induire une réponse cellulaire.

La voie classique de signalisation du TGF- β est médiée grâce à deux récepteurs qui sont TGF- β -RI/ALK5, TGF- β -RII. Les deux glycoprotéines transmembranaires, qui constituent les récepteurs de type I et II, présentent une activité Sérine/Thréonine kinase. Le TGF- β actif se fixe sur son récepteur, le TGF- β -RII. La fixation du TGF- β au récepteur TGF- β -RII induit l'activation par phosphorylation du TGF- β -RI. Puis, le TGF- β -RI phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Smad, les R-Smad (Smad2 et Smad3). Cette phosphorylation a pour effet d'induire un rapide changement conformationnel permettant l'association des R-

Smad avec les co-Smad. Les R-Smad phosphorylés forment alors avec le co-Smad Smad4, des complexes R-Smad/co-Smad. Les complexes R-Smad/co-Smad sont transloqués dans le noyau, où ils se fixent sur les séquences promotrices des gènes régulés par le TGF-. Ces séquences d'ADN spécifiques, le SBE (Smad Binding Element) ou CAGA-box conduisent à une induction des gènes mis sous leur contrôle. Néanmoins quelques rares inhibitions sont rencontrées. En effet, le RSBE (Repressive Smad Binding Element) ou le TIE (TGF- Inhibitory Elements) sont des séquences promotrices, placées en amont des gènes qu'elles contrôlent, et la fixation des Smads sur ces séquences va entraîner une inhibition de l'expression de ces gènes.

Ces complexes R-Smad/co-Smad, qui permettent de réguler l'expression des gènes cibles du TGF-, présentent une faible affinité pour l'ADN, ils vont donc nécessiter la présence de différents co-facteurs (co-activateurs transcriptionnels comme p300/CBP, ou facteurs de transcriptions comme AP1, Sp1, Foxo...) pour augmenter l'affinité et la spécificité de ces complexes pour l'ADN, induisant des activations ou des répressions de gènes cibles du TGF- (94). La diversité de combinaison R-Smad/co-Smad/co-facteurs va réguler les transcriptions des gènes codant pour des protéines impliquées de nombreux mécanismes aboutissant à des effets pléiotropes.

La régulation fine de la voie du TGF- liée aux Smads est assurée par différents partenaires cellulaires que sont SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation), Hgs (Hepatocyte Growth factor-regulated tyrosine kinase Substrate) ou Dab2 (Disabled homolog 2) qui vont permettre la phosphorylation et l'activation des R-Smads par TGF--RI. Cette régulation et les différentes combinaisons R-Smad/coSmad/cofacteurs permettent ainsi de mettre en œuvre des réponses cellulaires, qui sont différentes en fonction du type cellulaire, découlant d'une stimulation par le TGF-.

Le TGF- active également d'autres voies de signalisation (MAPK (Mitogen-activated protein kinase), PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)) qui peuvent interagir avec la voie des Smads et moduler ainsi l'activation des gènes Smad-dépendants.

Le TGF- a été décrit comme une cytokine conduisant à la prolifération des fibroblastes, mais dans la majorité des cellules (cellules épithéliales, lymphocytes) c'est un puissant inhibiteur de croissance. L'implication du TGF- dans de nombreux processus biologiques essentiels pour l'organisme ainsi que sa répartition cellulaire quasi-ubiquitaire explique son rôle dans de nombreuses pathologies comme la fibrose ou le cancer.

Lors du développement du cancer, les cellules impliquées dans ce processus vont progressivement acquérir des caractéristiques phénotypiques particulières aboutissant à en faire des cellules malignes. Ainsi les cellules cancéreuses vont tout d'abord acquérir la capacité de croître de façon autonome, puis d'ignorer les signaux cytotatiques, ensuite de favoriser l'angiogénèse avant d'envahir d'autres organes en métastasant (95).

Ainsi, lors du développement des cancers épithéliaux, le TGF- va jouer un double rôle. En effet, aux stades précoces de la tumorigénèse, il agit comme un suppresseur de tumeur en

inhibant la prolifération et provoquant l'apoptose cellulaire. Mais au cours de la tumorigénèse, les cellules cancéreuses sécrètent du TGF- β en grande quantité, et deviennent résistantes à ses effets antiprolifératif et apoptotique (94). Dans les stades tardifs de la tumorigénèse, le TGF- β agit comme un promoteur de tumeur en induisant une transition épithélium-mésenchyme (TEM) qui favorise la formation de métastases (96).

La TEM est le processus par lequel les cellules épithéliales acquièrent des caractères mésenchymateux et de migration après avoir perdu leurs marqueurs d'adhérence. Ce processus est la clef de voûte de l'embryogenèse, car il permet la dédifférenciation cellulaire, la migration cellulaire et la production de la matrice extracellulaire aboutissant à l'organogénèse. L'inactivation d'ALK5 (Activin-Like Kinase 5) aussi appelé TGF- β -RI, en perturbant l'angiogénèse, chez la souris est létale pour l'embryon, démontrant l'utilité de la TEM associée aux voies induites par le TGF- β . Malheureusement des altérations du système de signalisation du TGF- β vont promouvoir, pour les cellules engagées dans un processus cancéreux, l'apparition de métastases en permettant la migration et l'invasion cellulaire (97). En effet, lors de la cancérogénèse la signalisation dépendante des Smads est souvent altérée soit par mutation, soit par l'activation de voies de signalisation comme AKT ou Erk qui vont diminuer l'activité des protéines Smads. L'ensemble de ces faits est associé à un pronostic peu favorable pour le patient (98). Des travaux récents ont montré que des niveaux élevés de TGF- β sont corrélés avec la présence de métastases osseuses et ganglionnaires dans les cancers mammaires, prostatiques et hépatiques. Les patients atteints d'hépatite B ou C présentent des niveaux de TGF- β élevés dans le sérum. Le TGF- β est de plus considéré comme la principale cytokine profibrosante pour le foie. En effet, le TGF- β en activant les cellules étoilées du foie entraîne la production par ces dernières d'une grande quantité de matrice extracellulaire composée de fibronectine et de collagène. Le TGF- β induit également la libération d'autres facteurs pro-fibrogènes comme les inhibiteurs des metalloprotéinase 1.

Lors de l'infection par le VHC, l'activation des cellules étoilées par la capside du VHC induit une augmentation de l'expression de l'alpha-SMA (alpha-Smooth Muscle Actin) par l'intermédiaire de l'IL-8 (Interleukin-8), et conduit également à la fibrogenèse (85). Enfin, la protéine de capside interagit également avec cette voie du TGF- β en prenant pour cible un intermédiaire de cette voie la protéine smad3, en diminuant ainsi les transcriptions dépendantes de Smad3. Smad3 est un facteur de transcription majeur de la voie de signalisation du TGF- β (99).

Il a été récemment montré que le TGF- β pouvait provoquer la TEM dans des hépatocytes *in vitro* et *in vivo* (100). De façon intéressante, notre équipe a observé que l'expression de la protéine de capside dans des hépatocytes murins ou humains primaires et dans des lignées de cellules d'hépatomes diminuait les effets du TGF- β en terme d'arrêt de croissance ou d'apoptose et au contraire potentialisait les effets du TGF- β en terme d'EMT. De plus, une protéine de capside isolée à partir d'un nodule tumoral est plus efficace pour moduler ces effets qu'une capside isolée à partir d'un nodule non tumoral. Ce résultat suggère qu'une

sélection de quasi-espèces dans les tumeurs serait impliquée dans la tumorigénese hépatique pour déplacer l'équilibre entre les effets antitumoraux et protumoraux du TGF- β . De plus, l'expression de la capside augmente le développement d'une TEM. L'utilisation de cellules invalidées pour Smad 3 suggère que cet effet de la capside est lié à une atténuation de l'activation de la voie Smad3 (91, 101).

Ces résultats obtenus à partir d'un seul couple de capsides isolées d'un nodule tumoral ou non tumoral suggèrent donc que cette protéine virale pourrait déplacer l'équilibre entre les effets antitumoraux et protumoraux du TGF- β .

I.5 Objectif du travail

Il a été montré *in vivo*, chez des patients atteints de CHC, que la séquence de la polymérase virale NS5b d'un même génotype ne montre aucune variabilité entre les différents clones obtenus des zones tumorales ou non tumorales. Mais chez ces mêmes patients les séquences de capsides, issues de zones tumorales, présentaient une variabilité génétique au niveau nucléotidique, supérieure à celles issues des zones non tumorales. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une sélection de variants de capside particuliers dans les différentes zones étudiées et suggèrent la présence d'une quasi-espèce spécifique pour la capside du VHC dans les zones tumorales et non tumorales (103). Ces variants, isolés dans des compartiments différents, pourraient donc avoir des propriétés biologiques différentes.

Des travaux de notre laboratoire réalisés sur un nombre restreint de variants de protéine de capside, montrent que ces protéines diminuent l'activation de la voie de signalisation du TGF- β . De plus l'expression d'une protéine de capside isolée à partir d'un nodule tumoral était plus efficace pour provoquer ces effets qu'une protéine isolée à partir d'un nodule non tumoral. L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β par ces variants naturels isolés de zones tumorales est basée sur un mécanisme d'interaction entre la protéine de capside du VHC et la protéine Smad3, qui est le facteur majeur de transcription de cette voie de signalisation (91, 99).

Ces résultats nécessitant une confirmation sur un effectif plus important, nous avons créé une collection de variants de capsides, composée de deux groupes distincts. Le premier groupe est constitué de variants isolés à partir de zones tumorales et non tumorales de foies de patients présentant un CHC. Le deuxième, se compose de variants de capsides isolés du sérum et du foie de patients ayant après transplantation hépatique développé une fibrose cholestasienne, ainsi que de patients témoins appariés (ayant développé une fibrose mineure pendant la même période après transplantation).

Du fait de la survenue très rapide de l'HFC (Hépatite fibrosante cholestasienne) (quelques mois) en opposition à la survenue du CHC (plusieurs années) et de l'implication du TGF- β dans ces deux pathologies, notre hypothèse de travail est que la capside, en modifiant les réponses biologiques du TGF- β pourrait intervenir dans ces pathologies.

L'analyse d'un nombre plus important de variants naturels de la capside du VHC devrait permettre de mieux comprendre l'impact de la variabilité génétique de cette protéine sur l'inhibition provoquée au niveau des réponses au TGF- β et de confirmer les résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire (91).

Cette analyse des différentes protéines de capsides suivra deux axes, une étude de la compartimentation des quasi-espèces de capside pour chaque patient et l'impact de cette compartimentation (variabilité génétique) des différents variants de la protéine de capside sur

la signalisation du TGF- β et la localisation cellulaire de la capside.

Bibliographie

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
2. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 1975 Apr 10;292(15):767-70.
3. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2009 Nov;51(5):939-48.
4. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000 Mar 11;355(9207):887-91.
5. Giannini C, Brechot C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10 Suppl 1:S27-38.
6. Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181-182:35-8.
7. Takahashi T, Ashizawa S, Matsumoto H, Furuta K, Omura T, Sato K, et al. Fibrosing cholestatic hepatitis developing after liver transplantation: case report of a patient with HCV-related cirrhosis. *Transplant Proc*. 2003 Feb;35(1):392-3.
8. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Feb;17(2):107-15.
9. Rhoads J. Natural history and epidemiology of hepatitis C. *J Assoc Nurses AIDS Care*. 2003 Sep-Oct;14(5 Suppl):18S-25S.
10. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007 May 7;13(17):2436-41.
11. Lot F, Delarocque-Astagneau E, Thiers V, Bernet C, Rimlinger F, Desenclos JC, et al. Hepatitis C virus transmission from a healthcare worker to a patient. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Feb;28(2):227-9.
12. Paez Jimenez A, Sharaf Eldin N, Rimlinger F, El-Daly M, El-Hariri H, El-Hoseiny M, et al. HCV iatrogenic and intrafamilial transmission in Greater Cairo, Egypt. *Gut*. 2010 Nov;59(11):1554-60.
13. Levvero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3834-47.
14. Maillard E. [Epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatocellular carcinoma.]. *Cancer Radiother*. 2011 Jan 14.
15. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:9-16.
16. Grange JD. [Treatment of acute hepatitis C]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2002 Apr;26 Spec No 2:B32-7.
17. Durantel D, Vuillermoz I. Données biologiques sur le virus de l'hépatite C: organisation du génome, modèles d'études, expression et fonction des protéines, et cycle cellulaire. . In: Eurotext JL, editor. *Hépatites virales B et C*. Paris2006.
18. Lejeune O. Histoire Naturelle de la maladie du foie. In: Eurotext JL, editor. *Hépatites virales B et C*. Paris2006.
19. Deuffic S, Buffat L, Poynard T, Valleron AJ. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology*. 1999 May;29(5):1596-601.
20. Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol*. 2004 Feb;40(2):341-52.
21. Laperche S, Le Marrec N, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):3877-83.
22. Beld M, Sentjens R, Rebers S, Weegink C, Weel J, Sol C, et al. Performance of the New Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor, Version 2.0, assay. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):788-93.
23. Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*. 2007 Aug;127(2):131-50.
24. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):962-73.
25. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994 May;19(5):1321-4.
26. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of

- the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2451-5.
27. Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, Carolla P, Meuleman P, Leroux-Roels G, et al. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):2019-31.
28. Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, Samuel D, Petit MA, et al. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol*. 1999 Nov;73(11):9213-21.
29. Hourieux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, Moreau A, Trassard S, et al. The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut*. 2007 Sep;56(9):1302-8.
30. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, et al. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*. 1996 Aug 1;222(1):31-42.
31. Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J*. 1995 Dec 1;14(23):6010-20.
32. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 1992 Mar;66(3):1476-83.
33. Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology*. 1999;42(2-3):145-52.
34. Krekulova L, Rehak V, Riley LW. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol (Praha)*. 2006;51(6):665-80.
35. Shi ST, Lai MMC. HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. 2006.
36. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000 Apr;14(2):241-54.
37. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005 Jul;11(7):791-6.
38. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998 Oct 30;282(5390):938-41.
39. Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, Balfe P, et al. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2006 Nov;80(22):11331-42.
40. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):588-98.
41. Rhainds D, Bourgeois P, Bourret G, Huard K, Falstraalt L, Brissette L. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci*. 2004 Jul 1;117(Pt 15):3095-105.
42. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 Dec;46(6):1722-31.
43. Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):801-5.
44. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol*. 2009 Feb;83(4):2011-4.
45. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*. 2007 Nov;81(22):12465-71.
46. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology*. 2008 Oct;48(4):1044-53.
47. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*. 2011 May;17(5):589-95.
48. Imbert I, Dimitrova M, Wolf M, Schuster C. Réplication du virus de l'hépatite C : systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie*. 2004 Juillet-août;8(4):281-95.
49. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000 Jan;7(1):2-14.
50. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 2002 Aug 1;21(15):3980-8.
51. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, et al. The native form

- and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1998 Jul;72(7):6048-55.
52. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1994 Jun;68(6):3631-41.
 53. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2001 Mar;75(5):2119-29.
 54. Nolandt O, Kern V, Muller H, Pfaff E, Theilmann L, Welker R, et al. Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J Gen Virol.* 1997 Jun;78 (Pt 6):1331-40.
 55. Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol.* 2000 Aug;81(Pt 8):1913-25.
 56. McLauchlan J. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):986-90.
 57. Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol.* 1997 Jan;71(1):657-62.
 58. Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, et al. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol.* 1995 Jan;76 (Pt 1):53-61.
 59. Budkowska A, Kakkanas A, Nerrienet E, Kalinina O, Maillard P, Horm SV, et al. Synonymous mutations in the core gene are linked to unusual serological profile in hepatitis C virus infection. *PLoS One.* 2011;6(1):e15871.
 60. Ratnien M, Boulant S, Crussard S, McLauchlan J, Lavergne JP. Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus Res.* 2009 Jan;139(1):106-10.
 61. Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life.* 2009 Jul;61(7):739-52.
 62. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 2007 May 7;13(17):2406-15.
 63. Haqshenas G, Mackenzie JM, Dong X, Gowans EJ. Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome. *J Gen Virol.* 2007 Jan;88(Pt 1):134-42.
 64. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 2007 Jul;3(7):e103.
 65. Wang K, Xie S, Sun B. Viral proteins function as ion channels. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Feb;1808(2):510-5.
 66. Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol.* 2007 Jan;9(1):63-9.
 67. Kwong AD, Kim JL, Rao G, Lipovsek D, Raybuck SA. Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.* 1999 Feb;41(1):67-84.
 68. Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14545-50.
 69. Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, Frick DN, Glenn JS, Tellinghuisen TL, et al. Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Res.* 2010 Apr;86(1):79-92.
 70. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 2002 Jun;76(12):5974-84.
 71. He Y, Staschke KA, Tan SL. HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication. 2006.
 72. Lim YS, Hwang SB. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation. *J Biol Chem.* 2011 Apr 1;286(13):11290-8.
 73. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet.* 1998 Oct 31;352(9138):1426-32.
 74. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.* 1998 Nov 19;339(21):1485-92.
 75. Liu-Young G, Kozal MJ. Hepatitis C protease and polymerase inhibitors in development. *AIDS Patient Care STDS.* 2008 Jun;22(6):449-57.
 76. Belon CA, Frick DN. Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virol.* 2009 May 1;4(3):277-93.

77. Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med*. 2010 May 5;2(30):30ra2.
78. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus Resistance to Protease Inhibitors. *J Hepatol*. 2011 Jan 29.
79. Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology*. 1996 Dec 15;226(2):176-82.
80. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2256-9.
81. Delhem N, Sabile A, Gajardo R, Podevin P, Abadie A, Blaton MA, et al. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene*. 2001 Sep 13;20(41):5836-45.
82. Herzer K, Weyer S, Krammer PH, Galle PR, Hofmann TG. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor suppressor protein promyelocytic leukemia function in human hepatoma cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10830-7.
83. Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, et al. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34122-30.
84. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*. 1997 Jul;78 (Pt 7):1527-31.
85. Clement S, Pascarella S, Conzelmann S, Gonelle-Gispert C, Guilloux K, Negro F. The hepatitis C virus core protein indirectly induces α -smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J Hepatol*. 2010 May;52(5):635-43.
86. Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic*. 2008 Aug;9(8):1268-82.
87. Roohvand F, Maillard P, Lavergne JP, Boulant S, Walic M, Andreo U, et al. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem*. 2009 May 15;284(20):13778-91.
88. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1065-7.
89. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):352-65.
90. Li T, Li D, Cheng L, Wu H, Gao Z, Liu Z, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by hepatitis C virus core protein in cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul;17(7):1937-44.
91. Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D, Zignego AL, et al. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF- β responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2009;4(2):e4355.
92. Khalil N. TGF- β : from latent to active. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(15):1255-63.
93. Koli K, Wempe F, Sterner-Kock A, Kantola A, Komor M, Hofmann WK, et al. Disruption of LTBP-4 function reduces TGF- β activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *J Cell Biol*. 2004 Oct 11;167(1):123-33.
94. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):807-21.
95. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
96. Sheahan S, Bellamy CO, Harland SN, Harrison DJ, Prost S. TGF β induces apoptosis and EMT in primary mouse hepatocytes independently of p53, p21Cip1 or Rb status. *BMC Cancer*. 2008;8:191.
97. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):8621-3.
98. Joshi A, Cao D. TGF- β signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect. *Front Biosci*. 2010;15:180-94.
99. Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O, et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF- β pathway. *Oncogene*. 2005 Sep 8;24(40):6119-32.
100. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23337-47.
101. Battaglia S, Benzoubir N, Ghigna MR, Guettier C, Brechot C, Bourgeade MF. [Epithelial-mesenchymal

- transition and hepatocellular carcinoma]. *Ann Pathol*. 2009 Nov;29 Spec No 1:S65-6.
102. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2021-36.
 103. Ruster B, Zeuzem S, Krump-Konvalinkova V, Berg T, Jonas S, Severin K, et al. Comparative sequence analysis of the core- and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. *J Med Virol*. 2001 Feb;63(2):128-34.
 104. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*. 1982 Sep;42(9):3858-63.
 105. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
 106. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007 Aug;24(8):1596-9.
 107. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406-25.
 108. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20.
 109. Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 9;93(14):7085-90.
 110. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7413-7.
 111. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
 112. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
 113. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
 114. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967 Sep 7;28(5):815-20.
 115. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, et al. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science*. 1996 Apr 26;272(5261):537-42.
 116. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 2011 May 4.
 117. Swofford DL. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2000.
 118. Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Dec;100(12):2465-8.
 119. Fishman SL, Factor SH, Balestrieri C, Fan X, Dibisceglie AM, Desai SM, et al. Mutations in the hepatitis C virus core gene are associated with advanced liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):3205-13.
 120. Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*. 1995 Dec;11(6):681-4.
 121. Tuplin A, Evans DJ, Simmonds P. Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol*. 2004 Oct;85(Pt 10):3037-47.
 122. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001 May;7(5):710-21.
 123. Tang X, Wagoner J, Negash A, Austin M, McLauchlan J, Hahn YS, et al. Functional characterization of core genes from patients with acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2010 Mar 15;201(6):912-22.
 124. Ogata S, Nagano-Fujii M, Ku Y, Yoon S, Hotta H. Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3625-30.

125. Shimizu YK, Igarashi H, Kanematu T, Fujiwara K, Wong DC, Purcell RH, et al. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol*. 1997 Aug;71(8):5769-73.
126. Horie T, Shimizu I, Horie C, Yogita S, Tashiro S, Ito S. Mutations of the core gene sequence of hepatitis C virus isolated from liver tissues with hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 1999;Volume 13(Number 3):240-51.
127. Horie C, Iwahana H, Horie T, Shimizu I, Yoshimoto K, Yogita S, et al. Detection of different quasispecies of hepatitis C virus core region in cancerous and noncancerous lesions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 26;218(3):674-81.
128. Alam SS, Nakamura T, Naganuma A, Nozaki A, Nouse K, Shimomura H, et al. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: the core protein-encoding region. *Acta Med Okayama*. 2002 Jun;56(3):141-7.
129. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):403-10.
130. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology*. 2007;50(5):361-8.
131. Fishman S, Lurie Y, Peretz H, Morad T, Grynberg E, Blendis LM, et al. Role of CYP2D6 polymorphism in predicting liver fibrosis progression rate in Caucasian patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2006 Apr;26(3):279-84.
132. Arenas JJ, Gallegos-Orozco JF, Laskus T, Wilkinson J, Khatib A, Fasola C, et al. Hepatitis C virus quasi-species dynamics predict progression of fibrosis after liver transplantation. *J Infect Dis*. 2004 Jun 1;189(11):2037-46.
133. Sullivan DG, Wilson JJ, Carithers RL, Jr., Perkins JD, Gretch DR. Multigene tracking of hepatitis C virus quasispecies after liver transplantation: correlation of genetic diversification in the envelope region with asymptomatic or mild disease patterns. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):10036-43.
134. Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL, Jr., Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol*. 1996 Nov;70(11):7622-31.
135. Lyra AC, Fan X, Lang DM, Yusim K, Ramrakhiani S, Brunt EM, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2002 Nov;123(5):1485-93.
136. Doughty AL, Painter DM, McCaughan GW. Post-transplant quasispecies pattern remains stable over time in patients with recurrent cholestatic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2000 Jan;32(1):126-34.
137. Silini E, Belli L, Brambilla S, Foti L, Gritti C, Lisa A, et al. Sequence variation in the hypervariable region 1 of hepatitis C virus and posttransplantation recurrent hepatitis. *Liver Transpl*. 2003 Oct;9(10):1040-7.
138. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol*. 2004 Mar;40(3):368-74.
139. Feliu A, Gay E, Garcia-Retortillo M, Saiz JC, Fornis X. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl*. 2004 Sep;10(9):1131-9.
140. Pessoa MG, Bzowej N, Berenguer M, Phung Y, Kim M, Ferrell L, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in patients with severe cholestatic hepatitis after liver transplantation. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1513-20.
141. Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC, et al. Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1996 May;23(5):971-6.
142. Farci P, Munoz SJ, Shimoda A, Govindarajan S, Wong DC, Coiana A, et al. Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis*. 1999 Apr;179(4):1007-11.
143. Hall CH, Kassel R, Tacke RS, Hahn YS. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. *PLoS One*. 2010;5(8):e12154.
144. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1200-5.
145. Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem*. 2002

- Feb 8;277(6):4261-70.
146. Moradpour D, Englert C, Wakita T, Wands JR. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*. 1996 Aug 1;222(1):51-63.
 147. Piodi A, Chouteau P, Lerat H, Hezode C, Pawlotsky JM. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):16-27.
 148. Williamson CD, Colberg-Poley AM. Access of viral proteins to mitochondria via mitochondria-associated membranes. *Rev Med Virol*. 2009 May;19(3):147-64.
 149. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol*. 2005 Sep;79(17):11353-65.
 150. Schwer B, Ren S, Pietschmann T, Kartenbeck J, Kaehlcke K, Bartenschlager R, et al. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):7958-68.
 151. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, et al. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):1271-81.
 152. Abecassis L, Rogier E, Vazquez A, Atfi A, Bourgeade MF. Evidence for a role of MSK1 in transforming growth factor-beta-mediated responses through p38alpha and Smad signaling pathways. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30474-9.
 153. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J Virol*. 2008 Mar;82(6):2606-12.