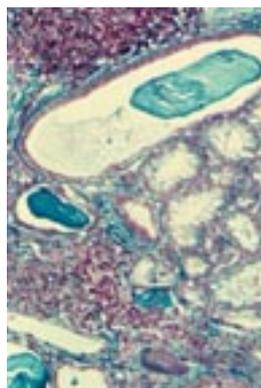


## Le virus de l'hépatite C

Jean-Michel Pawlotsky



> Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN monocaténaire linéaire de polarité positive, doté d'une capsidie icosaédrique et d'une enveloppe. Son génome comporte un cadre de lecture ouvert unique, traduit en une polyprotéine précurseur secondairement clivée pour donner naissance aux protéines virales structurales et non structurales. Celles-ci, dotées de multiples fonctions importantes pour la biologie du virus, interagissent de façon complexe avec les protéines cellulaires de l'hôte. Les cinétiques de répllication du VHC sont très rapides et caractérisées par un état d'équilibre au stade d'infection chronique. Le VHC est un virus variable. Les souches virales se classent en 6 génotypes et de nombreux sous-types et le virus a une distribution en quasi-espèces chez les sujets infectés. En dix ans, la connaissance du VHC et des mécanismes de l'infection a progressé de façon spectaculaire. Les progrès sont cependant freinés par l'absence de système de culture cellulaire productive et par la faible disponibilité de modèles animaux proches du modèle humain. Le développement récent de réplicons subgénomiques, la disponibilité de systèmes fonctionnels permettant de tester de nouvelles molécules à visée thérapeutique et les avancées de la recherche vaccinale chez la souris et le chimpanzé devraient permettre d'importants progrès au cours des dix prochaines années. <



Service de Bactériologie-  
Virologie,  
Hôpital Henri Mondor,  
51, avenue du Maréchal de Lattre  
de Tassigny,  
94010 Créteil, France.  
[jean-michel.pawlotsky@hmn.aphop-paris.fr](mailto:jean-michel.pawlotsky@hmn.aphop-paris.fr)

fonctions des protéines virales, et de mieux comprendre les mécanismes de la variabilité génétique virale et les cinétiques de la répllication. De nombreux modèles expérimentaux cellulaires ou animaux ont été développés, mais un système de culture cellulaire productive fait encore défaut.

### Structure des virions

Les particules virales n'ont jamais été visualisées avec certitude en microscopie électronique. Plusieurs groupes ont rapporté l'observation de particules d'allure virale au sein de vésicules cytoplasmiques dans différents organes et lignées cellulaires (foie de chimpanzé, lignées lymphocytaires B ou T), mais il n'y a aucune preuve qu'il s'agissait réellement du VHC.

L'ultracentrifugation en gradient de sucrose du sérum de sujets infectés par le VHC permet d'individualiser deux fractions riches en composants viraux : l'une de densité 1,09-1,10 g/ml, très infectieuse, constituée de virions associés à des lipoprotéines de faible densité (*very low density lipoproteins* ou VLDL et, peut-être, *low density lipoproteins* ou LDL), dont environ 30 % pourraient être

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989 par l'équipe de Michael Houghton (*Chiron Corporation*, Emeryville, Californie, États-Unis). L'intégralité du génome viral a été clonée et la comparaison avec les autres séquences virales connues a permis de classer le VHC au sein de la famille des *Flaviviridae*, dans un nouveau genre, créé pour lui, et aujourd'hui exclusivement constitué de ses variants, le genre *Hepacivirus*. La recherche très active menée au cours des dix dernières années a permis de mieux connaître la structure du virus et de son génome et les

défectueux ; l'autre, de densité 1,22-1,25 g/ml, faiblement infectieuse *in vivo* et *in vitro*, constituée de particules virales associées à des immunoglobulines spécifiques au sein de complexes immuns.

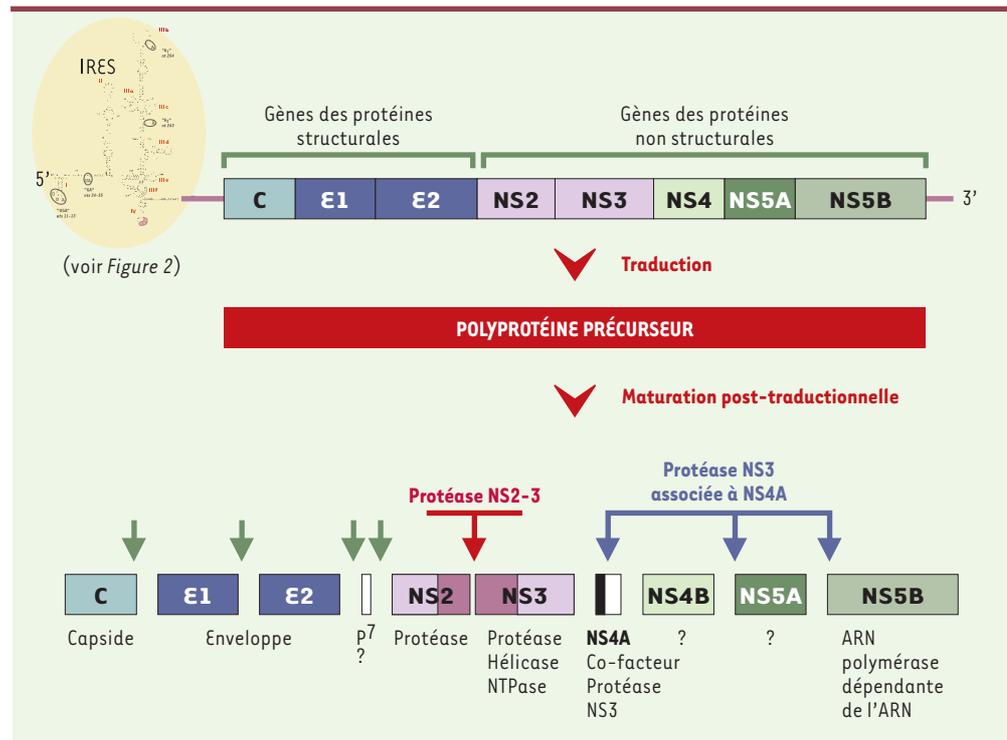
Les particules virales ont un diamètre de 55 à 65 nm. Elles sont constituées, de l'extérieur vers l'intérieur, de 3 structures : (1) une enveloppe lipidique au sein de laquelle sont ancrées deux glycoprotéines d'enveloppe virales, E1 et E2, organisées en complexes hétérodimériques non covalents ; (2) une capsid protéique formée par la polymérisation de la protéine de capsid C ; (3) le génome viral, constitué d'une molécule d'ARN simple brin.

## Structure du génome

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9,6 kb. Riche en G-C, il est très structuré dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les particules virales. Son organisation est voisine de celle du génome des Flavivirus et des Pestivirus, les deux autres genres de la famille des *Flaviviridae*. Il comprend trois régions distinctes de 5' en 3' : la région 5' non codante, le cadre de lecture ouvert et la région 3' non codante (Figure 1).

La région 5' non codante, constituée des 341 premiers nucléotides du génome, comprend 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction et 4 domaines riches en structures tiges-boucles. Le domaine I est le moins conservé. Les domaines II, III et IV forment le site interne d'entrée du ribosome (*internal ribosome entry site*, IRES) (Figure 2) [1], structure qui fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet l'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert. Le cadre de lecture ouvert débute par un codon AUG initiateur de la traduction situé dans le domaine IV de la région 5' non codante. Il comporte 9 024 à

9 111 nucléotides et code pour au moins 10 protéines virales distinctes (Figure 1), les protéines structurales (protéine de capsid C, glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), la protéine p7 dont on ne sait s'il s'agit d'une protéine structurale, d'une protéine non structurale, ou d'un simple produit de clivage, et les protéines non structurales, NS (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Enfin, la région 3' non codante comporte trois régions successives, de 5' en 3' : (1) une région non traduite d'environ 30 nucléotides, variable d'une souche virale à l'autre ; (2) une région poly-U/C de longueur variable ; (3) une région 3' terminale très conservée de 98 nucléotides, connue sous le nom de région X, repliée en trois tiges-boucles successives. Celle-ci semble jouer un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication et fixe une *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB), protéine impliquée dans l'initiation de la traduction sous le contrôle de l'IRES [2].



**Figure 1. Structure du génome du VHC.** Le génome du VHC est un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9,6 kb qui comprend une région 5' non codante, un cadre de lecture ouvert et une région 3' non codante. Son extrémité 5' ne comporte pas de coiffe méthylée, et la traduction se fait par un mécanisme d'entrée interne du ribosome au niveau de l'IRES. La traduction du cadre de lecture ouvert produit une polyprotéine précurseur dont la maturation post-traductionnelle conduit à la libération des protéines virales structurales (capsid, E1 et E2), de p7 et des protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Les clivages C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 sont effectués par des protéases cellulaires. La jonction NS2/NS3 est clivée par l'action auto-catalytique en *cis* de la protéase NS2-NS3, constituée par la partie C-terminale de NS2 et la partie N-terminale de NS3. La sérine protéase NS3 associée à son co-facteur NS4A assure quant à elle le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval : NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B.

## Cycle cellulaire et réplication

### Fixation au récepteur, internalisation et étapes précoces du cycle

Une interaction précoce entre la surface des glycoprotéines d'enveloppe et les glycosaminoglycane situés à la surface des cellules cibles pourrait être impliquée dans la reconnaissance et le tropisme cellulaire du virus [3], mais la (ou les) molécule(s) réceptrice(s) responsable(s) de la fixation et de l'internalisation du VHC ne

sont pas identifiées. Deux candidats récepteurs ont été proposés. La tétraspanine CD81, présente à la surface de nombreux types cellulaires comme les hépatocytes ou les lymphocytes B, semble capable de fixer spécifiquement la glycoprotéine d'enveloppe E2 *in vitro*. Cette interaction peut entraîner des modifications métaboliques de la cellule cible, mais l'internalisation des virions par son intermédiaire n'a pas été démontrée [4, 5]. Les virions infectieux pourraient également se fixer spécifiquement au récepteur des LDL, sans doute par le biais de leur interaction de surface avec les VLDL et les

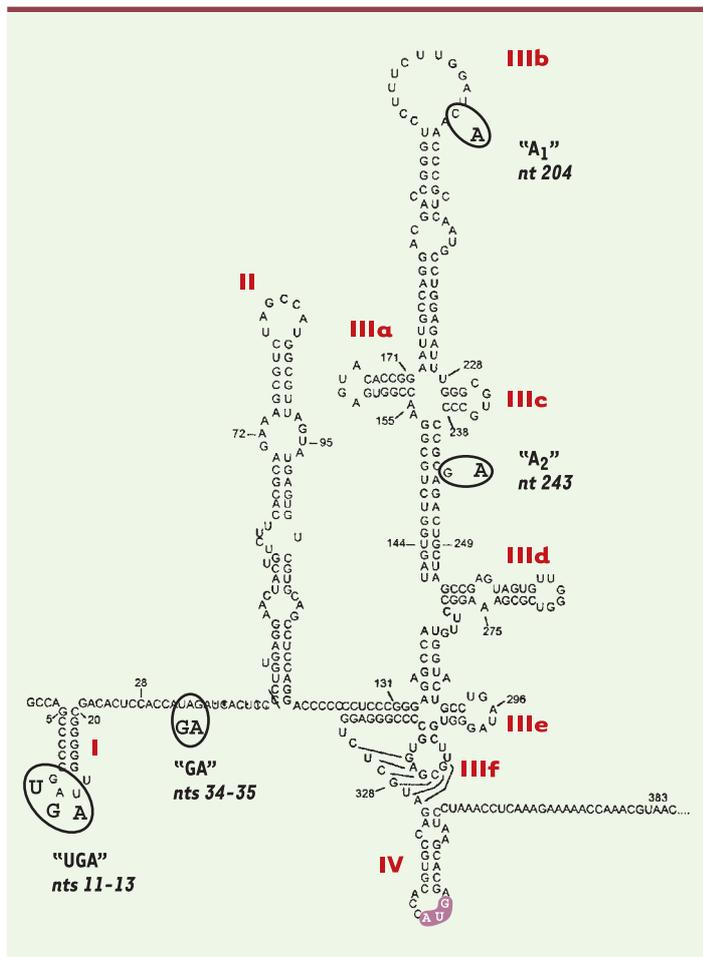
LDL, et cette fixation serait associée à une internalisation des particules virales [5, 6]. Il est probable que la fixation et l'internalisation des virions mettent en jeu plusieurs molécules associées formant un « complexe récepteur » au sein duquel les rôles respectifs des glycosaminoglycane de surface, du récepteur des LDL, de la molécule CD81 et d'autres constituants restent à définir.

Le mécanisme des étapes suivantes du cycle reste inconnu en l'absence de système cellulaire d'étude adéquat. Par analogie avec les *Flaviviridae*, on suppose qu'après l'endocytose, les génomes viraux sont libérés de leurs enveloppes dans des compartiments acides de type endosomes, puis largués dans le cytoplasme où ils vont servir d'ARN messagers pour la synthèse des protéines virales et de matrices pour la réplication.

### Synthèse des protéines virales

La synthèse des protéines virales commence par la traduction du cadre de lecture ouvert qui donne naissance à une polyprotéine précurseur virale unique (Figure 1). L'entrée du ribosome sur le messager se fait quelques nucléotides en amont du codon initiateur de la traduction [7]. L'extrémité 3' non codante du génome viral semble jouer un rôle régulateur dans la traduction du cadre de lecture ouvert.

Le clivage de la polyprotéine précurseur est assuré par au moins trois protéases, dont une cellulaire et deux virales (Figure 1) [8]. Les protéines structurales sont clivées par une peptidase située dans la lumière du réticulum endoplasmique [9]. Les protéines non structurales sont clivées par deux protéases virales [8], d'une part la protéase NS2-NS3, dotée d'une activité autocatalytique en *cis* permettant le clivage NS2-NS3 [10], d'autre part la sérine protéase NS3 qui, associée à son co-facteur NS4A, assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval. Les protéines NS5A et NS5B sont secondairement phosphorylées, et NS5A pourrait subir un clivage ultérieur par une protéase cellulaire libérant un produit doté d'un site de localisation nucléaire et de propriétés d'activateur transcriptionnel [11].



**Figure 2. Structure secondaire de la région 5' non codante du VHC.** La région 5' non codante du VHC comprend 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction, 4 domaines riches en structures tiges-boucles (les domaines I à IV, ce dernier contenant le codon AUG initiateur de la traduction du cadre de lecture ouvert), et un pseudo-nœud situé à l'intérieur du domaine III. Le domaine I est le moins conservé. Les domaines II, III et IV forment le site interne d'entrée du ribosome (*internal ribosome entry site*, IRES), structure qui fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet l'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert. Les 24 à 40 premiers nucléotides du cadre de lecture ouvert, situés dans le gène de la capsid, semblent participer à la structure et au fonctionnement de l'IRES, bien que ces résultats restent discutés. (Reproduit de [1] avec permission).

## Réplication

L'ARN polymérase dépendante de l'ARN (protéine NS5B) et les autres protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A) s'associent à des protéines cellulaires de l'hôte pour former le complexe de réplication [12]. Celui-ci est associé aux structures membranaires et vésiculaires péri-nucléaires, siège de la réplication virale. L'ARN polymérase synthétise un brin d'ARN négatif à partir du génome, qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN positifs qui seront encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées ou serviront de nouveaux messagers pour la synthèse des protéines virales.

## Assemblage et excrétion des virions

En l'absence de système de culture cellulaire adéquat, les étapes ultimes du cycle viral restent mal connues. L'assemblage est probablement déclenché par l'interaction entre l'ARN génomique et la protéine de capsid, qui aboutit à la formation de la nucléocapside par des mécanismes non encore élucidés. Par analogie avec les Flavivirus, les nucléocapsides pourraient ensuite s'envelopper par bourgeonnement à l'intérieur du réticulum endoplasmique et les particules virales pourraient être excrétées par exocytose.

## Structure et fonction des protéines virales

Les protéines virales structurales et non structurales possèdent de nombreuses fonctions et propriétés, dont certaines sont indispensables à la production des particules virales et d'autres semblent jouer un rôle important dans la pathogénie de la maladie virale C.

### Protéine de capsid C

Le clivage protéolytique du peptide signal situé à l'extrémité C-terminale de la protéine C donne naissance à une phosphoprotéine très basique de 21 kDa, qui comporte un segment hydrophobe à son extrémité C-terminale et reste localisée dans le cytoplasme, à proximité des membranes péri-nucléaires et du réticulum endoplasmique. Elle est très conservée d'une souche virale à l'autre et fortement antigénique. Sa principale fonction est de servir à la formation des capsides virales par polymérisation. Une forme de 19 kDa, produite par clivage protéolytique du segment hydrophobe C-terminal, pourrait migrer vers le noyau cellulaire et moduler certains gènes de transcription cellulaire [13].

De très nombreuses autres fonctions et propriétés potentielles de la protéine de capsid du VHC ont été décrites dans divers modèles *in vitro*. Elle pourrait ainsi inhiber ou induire l'apoptose selon le type cellulaire, contrôler l'acti-

tivité des promoteurs viraux et cellulaires, activer des facteurs transcriptionnels ou interagir avec l'apolipoprotéine AII. Sa coopération avec l'oncogène Ras a abouti à la transformation de fibroblastes primaires d'embryon de rat *in vitro*. Son expression chez des souris transgéniques a été associée de façon inconstante au développement d'une stéatose hépatique et de carcinomes hépatocellulaires [14-16]. L'existence de ces propriétés *in vivo* et leur rôle dans la pathogénie de l'infection restent controversés.

### Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines E1 (gp31) et E2 (gp70) sont des protéines de membrane entrant dans la composition des enveloppes virales. Comme les protéines transmembranaires de type I, elles comportent un ectodomaine N-terminal et une région hydrophobe C-terminale d'ancrage dans le réticulum endoplasmique et les structures apparentées. Les 27 acides aminés N-terminaux de E2 constituent la région hypervariable 1 (HVR1), exposée à la surface d'E2 et site d'un des principaux épitopes neutralisants du virus [17].

E1 et E2 peuvent former deux types de complexes : des hétérodimères E1/E2 constitués de protéines natives et stabilisés par des interactions non covalentes (voie productive) ; des agrégats hétérogènes liés par des ponts disulfures et interagissant avec des molécules chaperons (voie non productive), qui pourraient jouer un rôle de régulation négative de la formation des particules virales et de la réplication [18, 19].

Les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans la reconnaissance cellulaire et l'interaction des particules virales avec la (ou les) molécule(s) réceptrices et la pénétration du virus dans la cellule (voir cycle cellulaire et réplication). Il est probable qu'elles jouent également un rôle après l'internalisation, en particulier dans le déshabillage des particules enveloppées et dans l'assemblage des virions.

### p7

Le rôle de la protéine p7 est inconnu. Elle ne semble pas indispensable à l'assemblage des particules virales.

### NS2

La protéine non structurale NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa, insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique, qui forme avec l'extrémité N-terminale de NS3 une protéase auto-catalytique dont l'activité semble stimulée par le zinc [20].

### NS3 et NS4A

NS3 est une protéine hydrophile de 67 kDa qui possède un domaine protéase dans son tiers N-terminal et un

domaine NTPase/hélicase dans ses deux tiers C-terminaux. Il n'existe aucun argument suggérant que ces deux domaines fonctionnels soient séparés par clivage. Leur association pourrait être le résultat d'une interdépendance fonctionnelle.

L'activité sérine protéase de NS3 assure le clivage des protéines situées en aval (Figure 1). Elle dépend de la formation d'un hétérodimère stable avec NS4A, petite protéine transmembranaire de 54 acides aminés et nécessite la présence de zinc [21]. La résolution de la structure tri-dimensionnelle de NS3 et du complexe NS3-NS4A a récemment révélé que cette protéase est proche des chymotrypsines [22, 23]. Des inhibiteurs spécifiques de la protéase NS3-NS4A sont en cours de développement. La sérine protéase NS3 semble également capable d'interagir avec des protéines cellulaires de l'hôte au cours de l'infection et pourrait avoir des propriétés transformantes *in vitro* par des mécanismes non élucidés.

L'activité hélicase de NS3, conférée par son domaine C-terminal, pourrait servir à séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN viral au moment de la réplication, à abolir les structures secondaires des ARN positifs pour favoriser la traduction des protéines virales, et à permettre l'accès de l'ARN polymérase virale aux structures très repliées, telles que l'IRES et la région X de l'extrémité 3' non codante [24]. La structure tri-dimensionnelle de la NTPase/hélicase, associée ou non à un acide nucléique, a été récemment résolue en cristallographie aux rayons X [25, 26] et des inhibiteurs spécifiques sont en cours de développement. La portion hélicase de NS3 est également impliquée dans la régulation de la traduction du signal par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) et semble pouvoir influencer la survie et la prolifération de sa cellule hôte.

#### NS4B

NS4B est une petite protéine hydrophobe de 27 kDa, transmembranaire intégrale, et localisée dans la paroi du réticulum endoplasmique où elle est orientée vers le cytoplasme [27]. Elle est associée aux autres protéines non structurales au sein du complexe de réplication. Il a été suggéré que NS4B pourrait avoir des propriétés transformantes *in vitro*.

#### NS5A

NS5A est une protéine modérément hydrophile qui existe sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 et 58 kDa, qui diffèrent par leur degré de phosphorylation [28]. NS5A est localisée à proximité des membranes du réticulum endoplasmique où elle est associée aux autres protéines non structurales au sein

du complexe de réplication [29]. Sa fonction au sein de ce complexe reste inconnue. Elle participe probablement à la régulation de l'activité de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN.

En outre, NS5A possède de nombreuses propriétés qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de l'infection. Privée de sa partie N-terminale, elle possède une fonction d'activateur transcriptionnel *in vitro* [30] qui pourrait jouer un rôle physiologique. NS5A possède en effet un signal de localisation nucléaire situé en aval du site transactivateur et semble pouvoir être clivée par une protéase cellulaire en amont de ce site [11]. L'implication de cette fonction reste à déterminer, en particulier dans la carcinogenèse induite par le virus. De nombreuses interactions entre NS5A et des protéines cellulaires de l'hôte ont également été rapportées, dont le rôle physiologique (en particulier dans la résistance à l'interféron- $\alpha$  au cours de l'infection aiguë ou du traitement anti-viral) reste hypothétique [31].

#### NS5B

NS5B est une protéine phosphorylée de 68 kDa localisée à proximité des membranes péri-nucléaires au sein du complexe de réplication. Elle contient des motifs conservés caractéristiques des ARN polymérases dépendantes de l'ARN et son activité polymérasique a été démontrée *in vitro* [32, 33]. Sa structure tri-dimensionnelle a été récemment résolue par cristallographie aux rayons X [34]. Elle présente une structure en main droite classique, avec des « doigts » et un « pouce » définissant une « paume ». Elle interagit avec l'extrémité 3' de l'ARN viral et la polymérisation aboutit à la copie du génome complet (brin négatif à partir d'un brin positif, ou brin positif à partir d'un brin négatif). Les mécanismes intimes de la réplication virale restent incomplètement élucidés. Des inhibiteurs spécifiques de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN du VHC sont en cours de développement.

### Cinétiques de réplication virale

La modélisation mathématique de la décroissance de la charge virale sous traitement par interféron- $\alpha$  a récemment permis de mieux comprendre les cinétiques de réplication du VHC (Figure 3) [35]. Le foie des patients infectés contient deux compartiments virtuels, faits respectivement d'hépatocytes infectés et d'hépatocytes non infectés. Les hépatocytes infectés produisent chaque jour des quantités importantes de virions. Une partie de ces virions infectent de nouveaux hépatocytes, alimentant ainsi le réservoir d'hépatocytes infectés. Celui-ci décroît parallèlement du fait de la mort par

apoptose des hépatocytes infectés. La grande majorité des particules virales produites par les hépatocytes infectés est déversée dans la circulation générale. Elles y sont rapidement dégradées par des mécanismes mal élucidés mettant en jeu des phénomènes physiques et immunologiques. Les sites extra-hépatiques de réplication virale peuvent servir de sources marginales de production de virions et de cibles pour l'infection de nouvelles cellules.

### Cinétiques de réplication du VHC au cours de l'infection aiguë

Les cinétiques de réplication du VHC n'ont pas été étudiées au cours de l'infection aiguë humaine. Les seuls résultats disponibles ont été obtenus chez le chimpanzé infecté expérimentalement [36]. Dans ce modèle, une augmentation exponentielle biphasique de la charge virale a été observée, avec une première phase rapide pendant les deux premières semaines (temps de doublement de l'ordre de 1,7 jours) et une seconde phase plus lente pendant les 3 à 5 semaines suivantes (temps de doublement de l'ordre de 11,5 jours). Le ralentissement observé au cours de la deuxième phase pourrait être expliqué par la sécrétion de cytokines induite par l'infection. L'élévation biphasique de la charge virale était suivie d'un plateau, puis d'une décroissance significative au moment du pic des transaminases et de la séroconversion, sans doute liée à la réponse anti-virale cytotoxique. Cette décroissance aboutissait soit à l'élimination de l'infection (clairance des hépatocytes infectés), soit à une stabilisation en plateau, caractéristique de l'infection persistante [36].

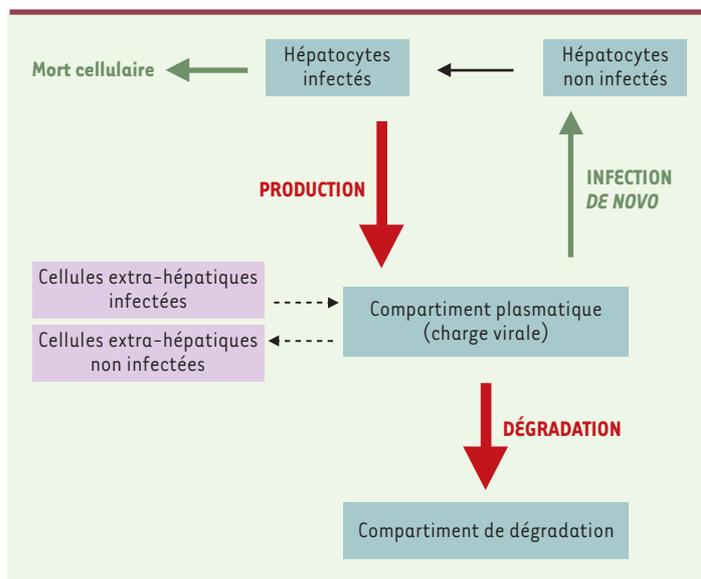
### Cinétiques de réplication du VHC au cours de l'infection chronique

Chez l'homme, l'infection chronique par le VHC est caractérisée par un état d'équilibre des cinétiques de réplication virale (Figure 3) [35]. L'infection de nouveaux hépatocytes est en effet compensée par la mort par apoptose des cellules infectées, garantissant une taille à peu près constante du réservoir de cellules infectées. La libération des virions dans la circulation générale est, quant à elle, compensée par leur dégradation périphérique, expliquant que la charge virale reste globalement inchangée au cours de l'infection chronique. Les cinétiques de réplication virale sont cependant très rapides, avec une demi-vie moyenne des particules virales dans la circulation générale estimée à moins de 3 heures, et une production-clairance quotidienne de l'ordre de  $10^{12}$  particules virales par jour [35]. La demi-vie des cellules infectées semble très variable d'un patient à l'autre, de l'ordre de 2 à 70 jours en moyenne [35]. L'administration de traitements anti-viraux et/ou immunomodulateurs modifie profondément l'équilibre des cinétiques de

réplication virale par des mécanismes variés liés aux modes d'action des molécules administrées (blocage de la production virale par les cellules infectées, inhibition de l'infection de nouvelles cellules, accélération de la mort des cellules infectées). Le déséquilibre induit est à l'origine de la décroissance de la charge virale sous traitement, qui peut être liée à une réduction du nombre de cellules infectées, à une réduction de la production de virus par les cellules infectées, ou à la combinaison des deux phénomènes. La guérison de l'infection passe par la clairance complète et définitive des cellules infectées de l'organisme.

### Variabilité génétique virale

La variabilité génétique du VHC est le résultat de l'abondance de la production quotidienne de particules virales par les cellules infectées et des propriétés de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN viral. Celle-ci commet en effet des erreurs au cours de la réplication, erreurs dont la fréquence est de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  par position nucléotidique. On estime qu'en moyenne une mutation nucléotidique survient sur chaque brin d'ARN synthétisé. En l'absence d'activité correctrice de la polymérase, les mutations s'accumulent au cours de la réplication. La majorité d'entre elles sont létales et conduisent à la



**Figure 3. Cinétiques de réplication du VHC à l'état d'équilibre au cours de l'hépatite chronique C** [37]. Il existe, chez l'homme infecté par le VHC, un état d'équilibre des cinétiques de réplication et de clairance virales. La taille du réservoir des cellules infectées est constante, la mort par apoptose des hépatocytes infectés étant compensée par l'infection de nouveaux hépatocytes. De même, la libération des virions dans la circulation est compensée par leur dégradation périphérique, ce qui explique que la charge virale soit globalement stable.

production de particules virales défectueuses. Les autres sont transmises à la descendance et les populations virales engendrées sont soumises à différents niveaux de pressions sélectives. Les pressions de sélection s'exerçant sur des populations d'individus infectés, liées à l'isolement géographique de certains groupes humains et/ou à leur isolement épidémiologique du fait de modes de transmission en circuit plus ou moins fermé, ont été à l'origine de l'émergence des génotypes viraux et sont responsables de leur diversification. Les pressions de sélection exercées par l'ensemble des réponses anti-virales chez un individu infecté donné sont à l'origine de la distribution en « quasi-espèces » du virus.

### Génotypes du VHC

L'analyse phylogénique des souches de VHC isolées dans différentes régions du monde a permis de définir six groupes principaux ou « types », numérotés de 1 à 6, et un grand nombre de « sous-types » au sein de chaque type, identifiés par des lettres minuscules [37]. Globalement, les types diffèrent entre eux par 31 à 34 % de leur séquence nucléotidique et environ 30 % de leur séquence amino-acidique, tandis que les sous-types diffèrent entre eux par 20 à 23 % de leur séquence nucléotidique. Certains variants isolés en Asie du Sud-Est ont un niveau de divergence intermédiaire entre le type et le sous-type. Ils ont été initialement désignés comme les types 7, 8, 9, 10 et 11. Proches du type 6 pour la plupart, et du type 3 pour le 10a, ils ont finalement été rattachés à ces derniers, bien qu'ils soient plus éloignés des autres sous-types que ceux-ci entre eux [37]. L'étude de la distribution mondiale des génotypes du VHC et de leurs relations phylogéniques permet de mieux comprendre leur émergence et leur diversification au cours des siècles, ainsi que les routes empruntées par l'épidémie mondiale d'hépatite C. L'origine des *Flaviviridae* rencontrés chez les primates pourrait remonter à la différenciation des espèces de primates il y a environ 35 millions d'années. Le VHC aurait co-évolué avec les populations humaines lors de leur migration hors d'Afrique au cours des 100 000 à 150 000 dernières années, tandis que ses variants actuels seraient apparus beaucoup plus récemment [38]. Une étude récente suggère l'émergence du type 6 il y a environ 700 ans, du type 4 il y a environ 350 ans, et des sous-types 1a et 1b il y a moins de 100 ans [39]. La fréquence et l'extrême diversité des sous-types des types 3 et 6 en Asie et des sous-types des types 1, 2, et 4 en Afrique suggèrent que ceux-ci sont apparus et se sont diversifiés dans ces régions respectives, où ils circulent sans doute depuis très longtemps parmi les populations locales. Cette hypothèse est

corroborée par la diversification lente des types 4 et 6, compatible avec une longue période d'endémie localisée [39]. Au contraire, le nombre limité de sous-types de chaque type en Europe, en Amérique, au Japon ou en Océanie suggère que l'hépatite C est une pathologie d'importation récente dans ces régions, évoluant sur un mode épidémique. La diversification rapide des sous-types 1a et 1b est le résultat de la diffusion planétaire de ces variants au cours des 100 dernières années [39], principalement par le biais de la transfusion de sang et de produits dérivés pour le génotype 1b, et par celle de la transfusion sanguine et de la toxicomanie par voie veineuse pour le génotype 1a [40]. L'épidémie d'hépatite C de génotype 3 est encore plus récente dans les pays industrialisés, comme en témoignent les faibles distances génétiques entre les souches isolées des cinq continents [41]. Leur introduction dans les pays industrialisés remonte en effet à la fin des années 1960, date à partir de laquelle leur diffusion s'est faite principalement chez les toxicomanes par voie veineuse [40, 41]. L'évolution génétique du génotype 1b semble aujourd'hui se ralentir, car la prévention de la transmission transfusionnelle de l'hépatite C a considérablement freiné la propagation de ce sous-type. L'absence de contrôle de l'épidémie liée à la toxicomanie par voie veineuse s'accompagne en revanche d'une évolution rapide des génotypes 1a et 3a, liée à leur diffusion [39].

### Distribution en quasi-espèces du VHC

Le VHC, comme de nombreux autres virus à ARN, circule chez chaque patient infecté sous la forme d'une quasi-espèce virale, c'est-à-dire d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts mais apparentés, car tous dérivés du même inoculum [42]. La distribution en quasi-espèces du VHC favorise sa survie. En effet, la présence simultanée de variants viraux différents et la rapidité avec laquelle de nouveaux variants émergent permettent la sélection rapide et continue des variants les mieux adaptés à l'environnement au sein duquel le virus se réplique. La capacité d'adaptation des quasi-espèces virales aux modifications de l'environnement joue un rôle important dans la physiopathologie de l'infection, aussi bien dans les mécanismes de persistance virale que dans la résistance aux traitements anti-viraux ou la récurrence de l'infection après transplantation hépatique.

A un instant donné de l'infection, la quasi-espèce virale d'un patient infecté est en équilibre. Cependant, les quasi-espèces virales se modifient en permanence pour s'adapter à l'environnement au sein duquel le virus se réplique et ce, sous l'influence de trois ordres de pressions évolutives.

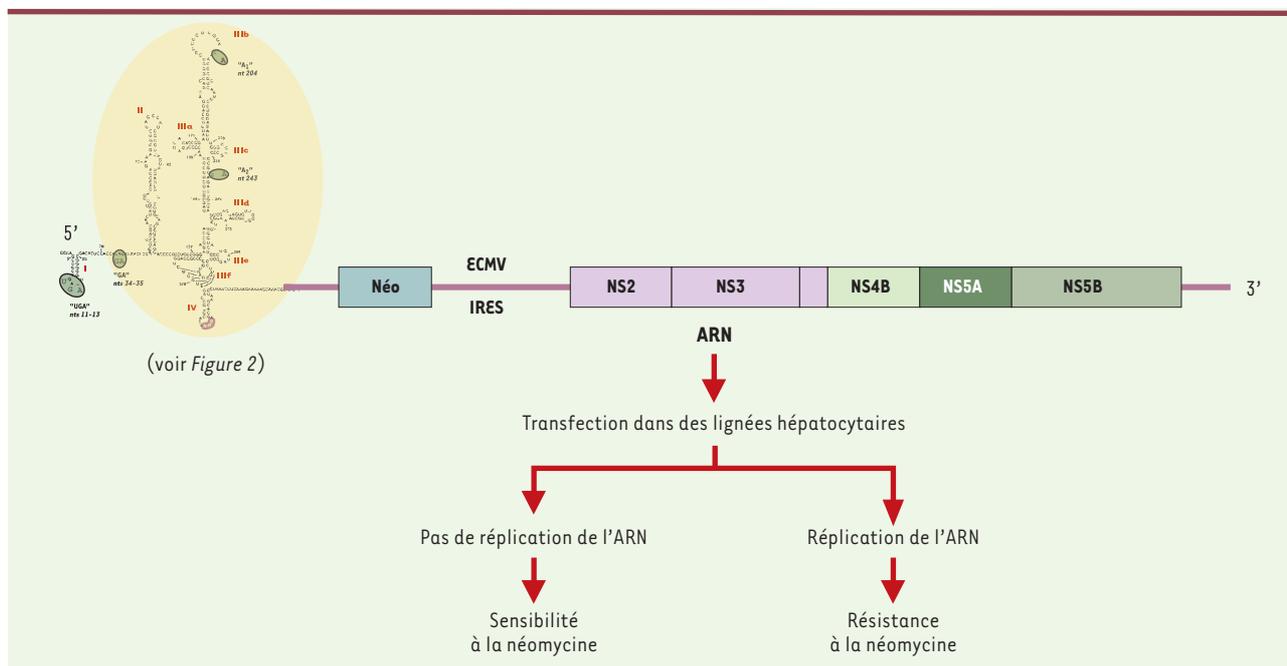
1. L'accumulation rapide et au hasard des mutations sur le génome viral au cours de la réplication aboutit, du fait de contraintes contradictoires voire antagonistes, à la sélection continue des variants les mieux adaptés.

2. Les pressions négatives, liées aux contraintes conservatrices sur la séquence du génome ou des protéines virales, résultent de la nécessité de conserver les propriétés fonctionnelles du génome et des protéines pour assurer la survie des variants.

3. Les pressions de sélection positive exercées sur le génome et les protéines virales résultent d'interactions complexes avec les réponses immunitaires et certaines protéines de l'hôte. Elles évoluent au cours du temps, spontanément ou sous l'influence de divers événements extérieurs (infection intercurrente, prise médicamenteuse, administration d'anti-viraux, etc.).

L'accumulation des mutations au cours de la réplication est également répartie sur toute la longueur du génome. La combinaison des pressions de sélection crée un véritable goulot d'étranglement génétique à travers lequel la quasi-espèce doit constamment se frayer un chemin pour survivre dans son environnement changeant, mais ces pressions varient considérablement d'une région du génome à l'autre, principalement en fonction du rôle

physiologique de la portion de génome ou de la protéine correspondante et des pressions immunes qui s'exercent sur la protéine. Par exemple, la région HVRI de la glycoprotéine d'enveloppe E2, cible des anticorps anti-VHC neutralisants, est soumise à de fortes pressions positives de la part de la réponse immune. Ces pressions sont responsables de sa variabilité et de son évolution génétique rapide au cours de l'infection chronique ou lorsque la réponse immune est profondément modifiée, par exemple lors d'un traitement par interféron- $\alpha$  [43]. HVRI est cependant également soumise à de fortes pressions conservatoires, liées à sa conformation spatiale et à son contenu en acides aminés basiques, qui résultent directement du rôle probable de cette région de la glycoprotéine d'enveloppe E2 dans les étapes précoces du cycle viral [3]. Les pressions conservatoires liées à la structure et à la fonction de la protéine NS5A et de la sérine protéase NS3 sont encore plus fortes, puisque celles-ci ne semblent tolérer que des changements d'acides aminés sporadiques, n'altérant pas les propriétés physico-chimiques des résidus [44]. Certaines mutations pourraient néanmoins modifier de façon marginale la structure de ces protéines et avoir des conséquences fonctionnelles, comme la réduction



**Figure 4. Répliquons subgénomiques du VHC.** Les répliquons subgénomiques contiennent de 5' en 3' : la séquence IRES du VHC, le gène codant pour la phosphotransférase de la néomycine (néo), la séquence IRES du virus de l'encéphalomyocardite (ECMV), les séquences codant pour les protéines non structurales NS2 à NS5B et la région 3' non codante du VHC. Ces répliquons sont dits «bicistroniques» car la synthèse de la phosphotransférase est dirigée par l'IRES du VHC, tandis que celle des protéines non structurales par l'IRES de l'ECMV. Après transfection des ARN dans des lignées hépatocytaires, la sélection est effectuée par l'ajout de néomycine. Comme la transfection n'est effectuée qu'avec l'ARN, seuls les clones cellulaires contenant des répliquons fonctionnels qui ont la capacité de se répliquer sont résistants à la néomycine.

de l'activation transcriptionnelle induite par NS5A. Enfin, les contraintes conservatoires les plus fortes semblent s'exercer dans la région 5' non codante, sur l'IRES dont la structure secondaire et tertiaire ne supporte que très peu de mutations, la plupart n'altérant pas sa stabilité (Figure 4).

### Tropisme cellulaire et compartimentation

L'analyse phylogénique des séquences virales isolées de différents compartiments de l'organisme, comme le foie, le sang périphérique ou les cellules sanguines, a permis de démontrer la compartimentation du VHC chez les individus infectés [45, 46]. Celle-ci pourrait être liée à des cinétiques différentes des variants dans les différents compartiments, mais surtout à un tropisme cellulaire de certains variants, c'est-à-dire à leur capacité de se fixer spécifiquement à différents types cellulaires, d'être internalisés et de se répliquer dans ces cellules.

L'existence de variants lymphotropes différents des variants hépatotropes a été évoquée initialement devant la répllication préférentielle dans des lignées cellulaires d'origine lymphoïde des variants isolés des lymphocytes périphériques d'un chimpanzé infecté expérimentalement [47]. Il est aujourd'hui établi que le VHC est capable de se répliquer en dehors des hépatocytes, au moins dans certaines sous-populations lymphocytaires B et dans les cellules dendritiques [46, 48, 49]. Les paramètres déterminant le tropisme cellulaire des variants de quasi-espèce du VHC semblent multiples. Les différences de séquence amino-acidique des glycoprotéines d'enveloppe, en particulier de la région HVR1, entre les variants isolés de différents compartiments suggèrent que la reconnaissance de ces variants dépend de molécules de surface cellulaire spécifiques du type cellulaire, comme par exemple les glycosaminoglycane [3]. Les étapes ultérieures de fixation et d'internalisation du virus ne seraient ensuite assurées que par les cellules possédant l'ensemble du système récepteur fonctionnel. La répllication virale de certains variants au profit d'autres, dans certaines cellules, pourrait être due à des facteurs cellulaires spécifiques interagissant avec l'IRES [50], ou nécessaires à la répllication du génome et à la synthèse des protéines virales.

### Modèles d'étude

De nombreux modèles expérimentaux ont été et sont utilisés pour étudier la répllication du VHC, le cycle viral et la pathogénie de l'infection. L'absence d'un système cellulaire productif stable et les différences de réponse à l'infection du chimpanzé, modèle animal permissif, et de

l'homme limitent cependant la progression des connaissances.

### Le chimpanzé

L'homologie génétique entre le chimpanzé et l'homme est de plus de 98,5 %. Le chimpanzé peut être infecté par le VHC et l'infection suit une progression identique à celle observée chez l'homme : présence d'ARN viral qui est détectable dans le sang périphérique quelques jours après l'infection ; hépatite aiguë caractérisée par une élévation de l'activité sérique des aminotransférases 2 à 20 semaines après l'infection ; développement d'une réponse immune adaptée ; évolution vers la guérison ou, dans 50 à 70% des cas, vers la persistance de l'infection en dépit d'une réponse immune humorale et cellulaire adaptée. Comme chez l'homme, l'infection chronique est associée à des lésions histologiques d'hépatite chronique et à un risque d'évolution vers le carcinome hépatocellulaire. L'utilisation du modèle chimpanzé est cependant limité par ses différences avec l'infection humaine (moindre sévérité de la maladie hépatique, réponses immunes atténuées) et par le coût très élevé de l'entretien des chimpanzés et leur accès limité en tant qu'espèce protégée. De nombreux travaux sont en cours sur ce modèle, qui visent en particulier à une meilleure compréhension des mécanismes de persistance de l'infection et au développement de vaccins thérapeutiques ou prophylactiques.

### Les autres primates

Le chimpanzé est le seul primate qui puisse être infecté par le VHC. L'infection du tamarin par le virus GB de type B (GBV-B), membre de la famille des *Flaviviridae* présentant 32 % d'homologie de séquence avec le VHC, peut constituer un modèle indirect d'étude des stades précoces de l'infection. Les espoirs reposent aujourd'hui sur le développement de virus chimères GBV-B/VHC qui puissent infecter le tamarin. D'autres primates pourraient s'avérer permissifs à l'infection par des chimères associant le VHC à d'autres virus.

### Les petits animaux

La souris reste un modèle expérimental facilement accessible et précieux pour l'étude des propriétés du VHC. Différentes lignées de souris transgéniques ont été utilisées pour étudier les effets pathogènes des protéines virales et des souris exprimant la totalité du génome viral sont en cours de développement. Des souris *knock-out* sont également utilisées pour identifier les composantes de la réponse immune qui s'opposent à la répllication du VHC, tandis que des souris transgéniques exprimant des gènes humains sont utilisées pour identifier des molé-

cules qui pourraient jouer un rôle de récepteur ou favoriser la réplication chez l'homme. Finalement, la xénogreffes d'hépatocytes humains ou de chimpanzés à des souris pourrait permettre dans le futur d'étudier la réplication du VHC *in vivo* [51].

### La réplication en culture cellulaire

Une réplication transitoire du VHC, sans production de particules virales infectieuses, a été obtenue sur différentes lignées cellulaires d'origine hépatocytaire ou lymphoïde. Le modèle le plus proche de l'infection humaine est la culture primaire d'hépatocytes humains normaux. Il a permis de montrer que l'interféron- $\alpha$  inhibe directement la réplication du VHC au sein des hépatocytes infectés. Il est également utilisé pour étudier les interactions du virus avec les molécules réceptrices et les mécanismes de la neutralisation.

Le développement récent de réplicons subgénomiques capables de se répliquer sur des lignées d'hépatomes humains représente une avancée considérable [52] (Figure 4). Ces systèmes se répliquent en effet très efficacement et aboutissent à la production de protéines virales en grandes quantités. Ils permettent d'étudier les interactions entre celles-ci et la cellule hôte et constituent un excellent modèle pour l'étude de molécules à visée thérapeutique inhibant spécifiquement la traduction ou la réplication du VHC.

### Les modèles cellulaires pour les études fonctionnelles

Différents modèles de cellules transfectées exprimant les protéines virales sont utilisés pour caractériser leurs interactions avec les composants de la cellule et certaines de leurs fonctions. Ces modèles restent cependant limités car il est difficile de démontrer que les interactions et les fonctions observées *in vitro* existent et jouent un rôle physiologique au cours de l'infection humaine. Des systèmes fonctionnels permettant de tester l'action des enzymes virales (protéases, hélicase, ARN polymérase dépendante de l'ARN) ont également été développés. Ces modèles s'avèrent particulièrement utiles pour tester des inhibiteurs spécifiques au stade pré-clinique de leur développement. ♦

## SUMMARY

### Hepatitis C virus

Hepatitis C virus (HCV) is a single, positive-strand RNA virus, with an icosahedral capsid and a lipidic envelope. Its genome contains a single open reading frame that translates into a precursor polyprotein, secondarily cleaved into both structural and nonstructural viral proteins. The HCV proteins bear various functions and interact with host infected cell proteins in a complex way. During chronic infection, HCV kinetics are characterized by a steady-state with a very high rate of virion production and clearance. HCV is variable: HCV strains can indeed be classified into 6 genotypes and a large number of subtypes, and HCV has a quasispecies distribution in infected patients. Spectacular progresses in the knowledge of HCV and the mechanisms of infection have been made during the past ten years. Progression is however slowed by the lack of a productive cell-culture system and reliable animal models. Major recent advances include the development of subgenomic replicons and other functional systems to test the inhibitory action of specific antiviral drugs, as well as vaccine developments. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999 ; 73 : 1165-74.
2. Kholylalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996 ; 70 : 336-71.
3. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 2001 ; 75 : 5703-10.



4. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998 ; 282 : 938-41.
5. Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000 ; 74 : 10055-62.
6. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 12766-71.
7. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992 ; 66 : 1476-83.
8. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993 ; 67 : 1385-95.
9. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994 ; 68 : 6147-60.
10. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 10583-7.
11. Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000 ; 270 : 476-87.
12. Ishido S, Fujita T, Hotta H. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 244 : 35-40.
13. Hussy P, Langen H, Mous J, Jacobsen H. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 1996 ; 224 : 93-104.
14. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996 ; 70 : 4438-43.
15. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998 ; 4 : 1065-7.
16. Sabile A, Perlemuter G, Bono F, et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999 ; 30 : 1064-76.
17. Farci P, Alter HJ, Wong DC, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7792-6.
18. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994 ; 68 : 6147-60.
19. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 1997 ; 71 : 697-704.
20. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993 ; 67 : 4665-75.
21. De Francesco R, Urbani A, Nardi MC, Tomei L, Steinhilber C, Tramontano A. A zinc binding site in viral serine proteinases. *Biochemistry* 1996 ; 35 : 13282-7.
22. Love RA, Parge HE, Wickersham JA, et al. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996 ; 87 : 331-42.
23. Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, et al. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998 ; 6 : 89-100.
24. Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. Towards defining a minimal functional domain for NTPase and RNA helicase activities of the hepatitis C virus NS3 protein. *Virus Res* 1997 ; 49 : 17-25.
25. Yao N, Hesson T, Cable M, et al. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* 1997 ; 4 : 463-7.
26. Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, et al. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998 ; 6 : 89-100.
27. Hogle T, Fehrman F, Bieck E, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 2001 ; 284 : 70-81.
28. Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 1997 ; 71 : 7187-97.
29. Polyak SJ, Paschal DM, McArdle S, Gale MJ Jr, Moradpour D, Gretch DR. Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 1999 ; 29 : 1262-71.
30. Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997 ; 71 : 8856-9.
31. Gale MJ Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999 ; 73 : 6506-16.
32. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996 ; 15 : 12-22.
33. Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 1997 ; 71 : 8416-28.
34. Bressanelli S, Tomei L, Rousset A, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 13034-9.
35. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998 ; 282 : 103-7.
36. Dahari H, Major M, Mihalik K, Feinstone S, Neumann AU. Lack of virus cytopathicity but strong IFN and cellular immune responses during primary

- HCV infection in chimpanzees. *Hepatology* 2000 ; 32 : 302A.
37. Robertson B, Myers G, Howard C, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses : proposal for standardization. *Arch Virol* 1998 ; 143 : 2493-503.
38. Simmonds P, Smith DB. Structural constraints on RNA virus evolution. *J Virol* 1999 ; 73 : 5787-94.
39. Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 2001 ; 292 : 2323-5.
40. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, *et al.* Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995 ; 171 : 1607-10.
41. Pawlotsky JM, De Gendt S, Beaucourt S, *et al.* Worldwide spread of hepatitis C virus genotype 3a among intravenous drug users. *Hepatology* 1998 ; 28 : 563A.
42. Martell M, Esteban JI, Quer J, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992 ; 66 : 3225-9.
43. Pawlotsky JM, Germanidis G, Frainais PO, *et al.* Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J Virol* 1999 ; 73 : 6490-9.
44. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998 ; 72 : 2795-805.
45. Navas S, Martin J, Quiroga JA, Castillo I, Carreno V. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol* 1998 ; 72 : 1640-6.
46. Afonso AM, Jiang J, Penin F, *et al.* Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999 ; 73 : 9213-21.
47. Shimizu YK, Igarashi H, Kanematu T, *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 ; 71 : 5769-73.
48. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, *et al.* *In vivo* tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998 ; 91 : 3841-9.
49. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : 512-24.
50. Laporte J, Malet I, Andrieu T, *et al.* Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 2000 ; 74 : 10827-33.
51. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001 ; 7 : 927-33.
52. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; 285 : 110-3.

#### TIRÉS À PART

J.M. Pawlotsky



## CNRSFormation

au service de l'Entreprise

- du 13 au 17 mai 2002  
à GIF SUR YVETTE (91) **Les puces à ADN : théorie et pratique**
- du 27 au 31 mai 2002  
à ORSAY (91) **Nouvelles techniques laser rapides appliquées à l'imagerie et à la spectroscopie de molécules chimiques et biologiques**
- du 10 au 14 juin 2002  
à ORSAY (91) **Initiation théorique et expérimentale aux techniques de base de la biologie moléculaire**
- du 17 au 21 juin 2002  
à ORSAY (91) **La PCR : quelques applications**
- du 17 au 21 juin 2002  
à ORSAY (91) **Initiation à la biologie moléculaire "du tissu à la séquence"**
- du 17 au 21 juin 2002  
à MARSEILLE (13) **Connaissance et protection de l'animal de laboratoire. Approche technique niveau II**

Catalogue, programmes et inscriptions :

**CNRSFormation** Avenue de la Terrasse Bât. 31 - 91198 Gif-sur-Yvette Cedex - FRANCE  
Tél. : 01 69 82 44 55 - Fax : 01 69 82 44 89 **Internet : <http://cnrsformation.cnrs-gif.fr>**