



9<sup>ème</sup> réunion  
du réseau national hépatites

● UIC Patrimoine,  
Paris 22 - 23 janvier 2009

# Programme et résumés

**22 - 23 janvier 2009**  
*Centre congrès UICP, Paris*



# SOMMAIRE

RECEPTOR COMPLEMENTATION AND TARGETED MUTAGENESIS REVEAL SR-BI AS AN ESSENTIAL HCV CELL ENTRY FACTOR AND FUNCTIONALLY IMPLY ITS INTRA- AND EXTRA-CELLULAR DOMAINS (M.DREUX) .....	10
SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I AND SERUM-DERIVED HEPATITIS C VIRUS INFECTION OF PRIMARY NORMAL HUMAN HEPATOCYTES (C.GONDEAU) .....	13
IDENTIFICATION DE DEUX KINASES CELLULAIRES IMPLIQUEES A LA FOIS DANS L'ENTREE ET LA REPLICATION DU VHC (M.TROTARD).....	14
ROLE DES GLYCANES DANS LES FONCTIONS DE PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHC (F.HELLE) .....	15
HEPATITIS C VIRUS ENTRY IS A VIABLE TARGET FOR PREVENTION OF RE-INFECTION IN LIVER TRANSPLANTATION (S.FAFI-KREMER) .....	16
CHARACTERIZATION OF THE MEMBRANE FUSION PROPERTIES OF CELL CULTURE-PRODUCED HEPATITIS C VIRUS PARTICLES (E-I.PECHEUR).....	17
ANALYSE DES DETERMINANTS D'ENTREE VIRALE PORTES PAR LES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VIRUS DE L'HEPATITE B (Y.LEDUFF) .....	18
L'ETABLISSEMENT DE L'INFECTION, LA REPLICATION ET LA PROPAGATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C SERIQUE (HCVSP) DEPENDENT DE L'ETAT DE PROLIFERATION /DIFFERENCIATION DES CELLULES HEPARG HUMAINES PROGENITRICES DU FOIE (N.NDONGO).....	19
ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES MEMBRANES CELLULAIRES ASSOCIEES AUX COMPLEXES DE REPLICATION DU VHC (P.FERRARIS) .....	20
GBF1 UN NOUVEAU FACTEUR CELLULAIRE NECESSAIRE POUR LA REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C (L.GOUESLAIN) .....	21
INVESTIGATING THE ROLE OF THE N-TERMINAL BASIC REGION OF THE HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN IN VIRAL REPLICATION (Z.MAKOWSKA).....	22
STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE POLYMERASES VIRALES : UN CONTEXTE POUR LA COMPREHENSION DE LA REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C (S.BRESSANELLI) .....	23
CARACTERISATION STRUCTURALE DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE LA POLYMERASE DU VIRUS DE L'HEPATITE C: ROLE DU CONNECTEUR A L'ANCRE TRANSMEMBRANAIRE (D.HARRUS).....	24
HEPATITIS C VIRUS NSSA PROTEIN IS A SUBSTRATE FOR THE PEPTIDYL-PROLYL CIS/TRANS ISOMERASE ACTIVITY OF CYCLOPHILINS A AND B (X.HANOULLE) .....	25
ROLE DE HBX DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE B DE LA LIGNEE HEPATOCYTAIRE HEPARG (O.HANTZ).....	26

TRANSACTIVATION OF THE HEPATITIS B VIRUS CORE PROMOTER BY THE NUCLEAR RECEPTOR FXRA (C.RAMIERE).....	27
LE VIRUS DE L'HEPATITE C INDUIT LA FIBROSE HEPATIQUE SANS INFLAMMATION CHEZ DES SOURIS TRANSGENIQUES EXPRIMANT LA TOTALITE DU CADRE OUVERT DE LECTURE VIRAL (P.CHOUTEAU) .....	28
HEPATITIS C VIRUS MODULATES HEPATOCYTE APOPTOSIS BY TARGETING BID (U.HIBNER).....	30
ANALYSE ULTRASTRUCTURALE ET QUANTITATIVE DES REGROUPEMENTS DE GOUTTELETTES LIPIDIQUES INDUITS PAR LA PROTEINE DE CORE DU VHC (M.DEPLA).....	31
N-TERMINAL UBIQUITINATION OF HEPATITIS B VIRUS X PROTEIN (S.BENHENDA).....	33
LE ROLE DU RETROTRANSPORT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE VERS LE CYTOPLASME DE LA PROTEINE PRECORE DU VIRUS DE L'HEPATITE B HUMAINE (M.DURIEZ) .....	34
HEPATITIS C VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN 2 DISTURBS THE SECRETORY PATHWAY AND ITS EFFECT IS COMPENSATED BY THE VIRAL ENVELOPE PROTEINS (N.CALLENS) .....	35
HEPATITIS C VIRUS INFECTION PROTEIN NETWORK (B.DE CHASSEY) .....	36
INHIBITION DRASTIQUE DE SECRETION DES HEPADNAVIRUS PAR UN PEPTIDE PERMEABILISANT (F.ABDUL).....	37
CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE MUTATION DE RESISTANCE (V36C) CHEZ UN PATIENT TRAITE AVEC UNE TRITHERAPIE DE TELAPREVIR, D'IFN-ALPHA 2A PEGYLE ET DE RIBAVIRINE (L.BARBOTTE).....	38
EFFET ANTIVIRAL DU BAY 41-4109 DANS UN MODELE ANIMAL HUMANISE ET INFECTE PAR LE VHB: LA SOURIS ALB-UPA/SCID (N.BREZILLON).....	40
REACTIVATION SOUS L'ASSOCIATION FLUTICASONE-RITONAVIR D'UNE INFECTION A VHB OCCULTE CHEZ UN PATIENT ANTI-HBS+ ET CO-INFECTE PAR LE VIH (A.KAY).....	41
NOUVELLE STRATEGIE ANTIVIRALE: DES ARN NEGATIFS CONTRE LE VHC (J.BITARD) .....	43
HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS PLASMACYTOID DENDRITIC CELL-ASSOCIATED PRODUCTION OF INTERFERON ALPHA (I.HIRSCH).....	44
UPTAKE AND TRAFFICKING OF CELL CULTURE-DERIVED HEPATITIS C VIRUS (HCVCC) IN HUMAN PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS (M.LAMBOTIN).....	45
REPONSE NEUTRALISANTE HUMORALE CONTRE LE VHC LORS DE LA COINFECTION PAR LE VIH ET DE LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE (G.MAURIN) .....	47
CRITICAL ROLE OF INTRA-HEPATIC CD4+CD25+FOXP3+ CELLS IN HCV INFECTED PATIENTS (E.JOUVIN-MARCHE).....	49
ÉTUDE DE L'ENCAPSIDATION DU GENOME DU VHC PAR MESURE DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTEINE CORE ET L'ARN VIRAL AU MOYEN D'UN VECTEUR LENTIVIRAL EX VIVO (E.PIVER) .....	50

<b>L'IRES DU VHC INTERAGIT AVEC LE MOTIF DE RECONNAISSANCE MRR DE LA SOUS UNITE B DU FACTEUR D'INITIATION EIF3 (J.PERARD) .....</b>	<b>51</b>
<b>ETUDE STRUCTURALE DE LA POLYMERASE MEMBRANAIRE DU VIRUS DE L'HEPATITE C. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA POLYMERASE ENTIERE (C.CAILLET-SAGUY) .....</b>	<b>52</b>
<b>DESCRIPTION D'UNE INSERTION V3-LIKE DANS LE GENE NSSA DU VIRUS DE L'HEPATITE C DE GENOTYPE 1B CHEZ DES PATIENTS CHRONIQUEMENT INFECTES (O.PETSARIS) .....</b>	<b>53</b>
<b>EFFETS FONCTIONNELS DES FORMES SECRETEES DU PRODUIT DU GENE PREC DU VHB SUR LES LYMPHOCYTES T (M.PURVINA). .....</b>	<b>55</b>
<b>ETUDE DES REPONSES IMMUNITAIRES INDUITES PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C : UTILISATION DE PUCES A PEPTIDES ET A PROTEINES (S.CORTES) .....</b>	<b>56</b>
<b>EFFET INHIBITEUR ET CALCINEURINE INDEPENDANT DE LA CYCLOSPORINE A SUR LES CELLULES T REGULATRICES CD4+CD25+ HUMAINES IN VITRO (C.MIROUX).....</b>	<b>58</b>
<b>POTENTIALISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE NEUTRALISANTE DU VACCIN À ADN DIRIGÉ CONTRE LE DHBV PAR CO-ADMINISTRATION DE GÈNES CODANT POUR DES CYTOKINES (F.SAADE).....</b>	<b>60</b>

## Programme

**Jeudi 22 janvier 2009**

---

**10h15-10h30: Accueil**

**10h30-10h45: Introduction**

**10h45-12h30: Session Entrée et Assemblage**

Modérateurs: Dimitri Lavillette et Laurence Cocquerel

1- Des approches de complémentation et mutagenèse dirigée révèlent un rôle essentiel pour SR-BI dans l'entrée du VHC et impliquent fonctionnellement ses domaines intra- et extra-cellulaires.

*Marlène Dreux, INSERM U758, Lyon*

2- Le récepteur SR-BI et l'infection d'hépatocytes primaires par du VHC dérivé de sérum de patients.

*Claire Gondeau, INSERM U632, Montpellier*

3- Identification de deux kinases cellulaires impliquées à la fois dans l'entrée et la réplication du VHC

*Maud Trotard, INSERM U 522, Rennes*

4- Rôle des glycanes dans les fonctions de protéines d'enveloppe du VHC

*François Helle, UMR8161, CNRS, Lille*

5- L'entrée du VHC est une cible intéressante pour la prévention de la ré-infection lors de la transplantation hépatique.

*Samira Fafi-Kremer, INSERM U748, Strasbourg*

6- Caractérisation des propriétés de fusion membranaire des particules VHCcc.

*Eve-Isabelle Pécheur, CNRS IBCP, Lyon*

7- Analyse des déterminants d'entrée virale portés par les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B.

*Yann Leduff, INTS, Paris*

**12h30-14h00: Pause déjeuner**

**14h00-15h00: conférencier invité**

« Structure and Function of the Hepatitis C Virus Replication Complex »

*Prof Darius Moradpour, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse*

**15h00-15h45: Session Traduction, Réplication, Transcription**

Modérateurs : *François Penin et Thomas Baumert*

1- L'établissement de l'infection, la réplication et la propagation du virus de l'hépatite C sérique (HCVsp) dépendent de l'état de prolifération /différenciation des cellules HepaRG humaines progénitrices du foie.

*Ndiémé Ndongo, INSERM, U871, Lyon*

2- Etude ultrastructurale et biochimique des membranes cellulaires associées aux complexes de réplication du VHC.

*Pauline Ferraris, INSERM U966, Tours*

3- GBF1 un nouveau facteur cellulaire nécessaire pour la réplication du virus de l'hépatite C

*Lucie Goueslain, UMR 8161 CNRS, Lille*

**15h45-16h15 : Pause**

**16h15-17h45: Session Traduction, Réplication, Transcription (suite)**

4- Investigation du rôle dans la réplication de la région basique N-terminale de la protéine core du VHC

*Zuzanna Makowska, INSERM 758, Lyon*

5- Structures cristallographiques de polymérases virales : un contexte pour la compréhension de la réplication du virus de l'hépatite C.

*Stéphane Bressanelli, Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette, France*

6- Caractérisation structurale des changements de conformation de la polymérase du virus de l'hépatite C : rôle du connecteur à l'ancre transmembranaire.

*Deborah Harrus, Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette, France*

7- La protéine NS5A du VHC est un substrat pour l'activité Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase des Cyclophilines A et B.

*Xavier Hanouille, UMR 8576 CNRS, Lille*

8- Rôle de HBx dans l'infection par le Virus de l'hépatite B de la lignée hépatocytaire HepaRG.  
*Olivier Hantz, INSERM Unit 871, Lyon*

9- Transactivation of the Hepatitis B virus Core Promoter by the Nuclear Receptor FXR $\alpha$   
*Christophe Ramière, INSERM U851, Lyon*

**18h00-19h00 : Session POSTERS**

**19h00-22h30: Cocktail dînatoire**

Vendredi 23 janvier 2009

---

**09h00-10h00: conférencier invité**

« Les déterminants d'entrée virale sur les protéines d'enveloppe du VHB »

*Dr Camille Sureau, INTS, Paris*

**10h00-10h45: Session Pathogénèse**

*Modérateurs: Hervé Lerat et Philippe Roingeard*

1- Le virus de l'hépatite C induit la fibrose hépatique sans inflammation chez des souris transgéniques exprimant la totalité du cadre ouvert de lecture viral.

*Philippe Chouteau, INSERM U841, Créteil*

2- Hepatitis C virus modulates hepatocyte apoptosis by targeting Bid.

*Urszula Hibner, CNRS UMR 5535, Montpellier*

3- Analyse ultrastructurale et quantitative des regroupements de gouttelettes lipidiques induits par la protéine de core du VHC.

*Marion Depla, INSERM U966, Tours*

**10h45-11h15: Pause**

**11h15-12h15: Session Pathogénèse (suite)**

4- Ubiquitination N-terminale de la protéine X du VHB

*Shirine Benhenda, Institut Pasteur, Paris*

5- Le rôle du rétrotransport du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme de la protéine Précore du virus de l'Hépatite B humaine.

*Marion Duriez, UMR 8159, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines*

6- La protéine NS2 du VHC perturbe la voie de sécrétion et cet effet est compensé par les protéines d'enveloppe.

*Nathalie Callens, CNRS, UMR 8161, Lille*

7- Hepatitis C virus infection protein network

*B. de Chasse, INSERM U 851, Lyon*

**12h15-13h45: Pause déjeuner**

**13h45-15h00: Session Antiviraux**

Modérateurs: D Durantel et Annette Martin

1- Inhibition drastique de sécrétion des hepadnavirus par un peptide perméabilisant.

*Fabien Abdul, INSERM U 871, Lyon*

2- Caractérisation d'une nouvelle mutation de résistance (V36C) chez un patient traité avec une trithérapie de telaprevir, d'IFN-alpha 2 alpha pegylé et de ribavirine.

*Laetitia Barbotte, INSERM U 841, Créteil*

3- Effet antiviral du BAY 41-4109 dans un modèle animal humanisé et infecté par le VHB : la souris Alb-uPA/SCID.

*Nicolas Brezillon, INSERM U 845, Paris*

4- Réactivation sous l'association Fluticasone-Ritonavir d'une infection à VHB occulte chez un patient anti-HBs<sup>+</sup> et co-infecté par le VIH

*Alan KAY, INSERM U 871, Lyon*

5- Nouvelle stratégie antivirale : des ARN négatifs contre le VHC.

*Michel VENTURA. Présentée par : Juliette BITARD, CNRS, UMR 5234, Bordeaux*

**15h00-15h30: Pause**

**15h30-16h30: Session Réponse immunitaire**

Modérateurs: Matthew Albert

1- Le VHC affecte la production d'interféron alpha des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

*Ivan Hirsch, INSERM, UMR891, Marseille*

2- Internalisation et trafic des particules VHCcc dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines

*Mélanie Lambotin, INSERM U748, Strasbourg*

3- Réponse neutralisante humorale contre le VHC lors de la coinfection par le VIH et de la transplantation hépatique

*Guillemette Maurin, INSERM U 758, Lyon*

4- Critical Role of Intra-hepatic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells in HCV infected patients.

*Evelyne Jouvin-Marche, INSERM U 823, Grenoble*

**16h30: CLOTURE**

# POSTERS

## SESSION DE POSTERS

1- Étude de l'encapsidation du génome du VHC par mesure de l'interaction entre la protéine Core et l'ARN viral au moyen d'un vecteur lentiviral *ex vivo*.

*Eric Piver, INSERM U 966, Tours*

2- L'IRES du VHC interagit avec le motif de reconnaissance MRR de la sous unité b du facteur d'initiation eIF3

*Julien Pérard, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble*

3- Etude structurale de la polymérase membranaire du virus de l'hépatite C : Production et purification de la polymérase entière

*Célia Caillet-Saguy, Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette*

4- Description d'une insertion V3-like dans le gène NS5A du virus de l'hépatite C de génotype 1b chez des patients chroniquement infectés.

*Odile Petsaris, CHU Morvan, Brest*

5- Effets fonctionnels des formes sécrétées du produit du gène préC du VHB sur les lymphocytes T.

*M. Purvina, UMR-8159, CNRS, Versailles*

6- Etude des réponses immunitaires induites par le virus de l'hépatite C : Utilisation de puces à peptides et à protéines

*Sandra Cortes, INSERM U823, Grenoble*

7- Effet inhibiteur et Calcineurine indépendant de la Cyclosporine A sur les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> humaines *in vitro*

*Céline Miroux, UMR 8161, CNRS, Lille*

8- Potentialisation de la réponse humorale neutralisante du vaccin à ADN dirigé contre le DHBV par co-administration de gènes codant pour des cytokines.

*Fadi Saade, INSERM U 871, Lyon*

# **RECEPTOR COMPLEMENTATION AND TARGETED MUTAGENESIS REVEAL SR-BI AS AN ESSENTIAL HCV CELL ENTRY FACTOR AND FUNCTIONALLY IMPLY ITS INTRA- AND EXTRA-CELLULAR DOMAINS**

Marlène Dreux (1); Viet Loan Dao Thi (1); Judith Fresquet (1); Maryse Guérin (2); Zélie Julia (2); Géraldine Verney (1); David Durantel (3); Fabien Zoulim (3); Dimitri Lavillette (1); Birke Bartosch (1); and François-Loïc Cosset (1).

(1) Université de Lyon, UCB-Lyon1, IFR128, Lyon, F-69007, France ; INSERM, U758, Lyon, F-69007, France ; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69007, France.

(2) INSERM, U551, Paris, F-75651, France.

(3) Université de Lyon, UCB-Lyon1, IFR62, Lyon, F-69008, France ; INSERM, U871, Lyon, F-69008, France; Hospices civils de Lyon (HCL), Lyon, F-69008, France.

HCV entry into cells is a multi-step and slow process. It is believed that the initial capture of HCV particles by glycosaminoglycans and/or lipoprotein receptors is followed by coordinated interactions with the scavenger receptor class B type I (SR-BI), a major receptor of high-density lipoprotein (HDL), the CD81 tetraspanin and the tight junction protein Claudin-1, ultimately leading to uptake and cellular penetration of HCV *via* low-pH endosomes. Several reports have indicated that HDL promotes HCV cell entry through interaction with SR-BI. This pathway remains largely elusive although it was shown that HDL neither associates with HCV particles nor modulates HCV binding to SR-BI. In contrast to CD81 and Claudin-1, the importance of SR-BI has only been addressed indirectly because of lack of cells in which functional complementation assays with mutant receptors could be performed. Here we identified for the first time two cell types that supported HCVpp and HCVcc entry upon ectopic SR-BI expression. Remarkably, the undetectable expression of SR-BI in rat hepatoma cells allowed unambiguous investigation of human SR-BI functions during HCV entry. By expressing different SR-BI mutants in either cell line, our results revealed features of SR-BI intracellular domains that influence HCV infectivity without affecting receptor binding and stimulation of cell entry induced by HDL/SR-BI interaction. Conversely, we identified positions of SR-BI ectodomain that, by altering HCV binding, inhibit cell entry. Finally, we characterized alternative ectodomain determinants that, by reducing SR-BI cholesterol uptake and efflux functions, abolish HDL-mediated infection-enhancement. Altogether, we demonstrate that SR-BI is an essential HCV entry factor. Moreover, our results highlight specific SR-BI determinants required during cell entry and physiological lipid transfer functions hijacked by HCV to favor infection.

## SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I AND SERUM-DERIVED HEPATITIS C VIRUS INFECTION OF PRIMARY NORMAL HUMAN HEPATOCTES

Claire Gondeau (1); Lydiane Pichard-Garcia (1); Philippe Briolotti (1); Amel Zahhaf (1); Laurent Martinez (2,3); Dominique Larrey (1,4); Jean-Michel Fabre (1,5); Francis Navarro (6); Antonio Sa-Cunha (7); Patrick Maurel (1)

(1) INSERM U632, Physiopathologie hépatique, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex5, France.

(2) INSERM, U563, and (3) Université Toulouse III Paul Sabatier, Département Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques, IFR30, 31000 Toulouse, France.

(4) Service d'Hépatogastroentérologie, (5) Service de Chirurgie Digestive II, (6) Service Médico-Chirurgical des Maladies de l'Appareil Digestif et Transplantation Hépatique, Hôpital Saint Eloi, 34095 Montpellier, France.

(7) Service de Chirurgie Digestive, Hôpital Haut Lévêque, 33075 Pessac, France.

Various cell surface molecules are candidate receptors for hepatitis C virus (HCV). A number of reports confirmed the role of the tetraspanin CD81 and the scavenger receptor SR-BI using retroviral HCV pseudotyped particles (HCVpp) and cell culture particles (HCVcc) in liver cell lines. However, these experimental models do not mimic the natural infection process, and several lines of evidence indicate that the infectious properties of HCV may be modulated by host factors that are present *in vivo*. Thus, a culture model using differentiated normal primary human hepatocytes isolated from surgical liver resection specimens and serum-derived hepatitis C virus (HCVser) has been developed in our laboratory. These cells retain liver phenotypic markers and are sensitive to HCV from sera and HCVcc particles. In both cases, the intracellular synthesis of positive and negative-sense HCV RNA strands can be evaluated. Based on this system, we previously demonstrated the critical role of the low-density lipoprotein receptor (LDL-r) and CD81 in HCV infection.<sup>1,2</sup>

We are currently addressing the role of SR-BI, a high-density lipoprotein-binding receptor, by comparative analysis of HCVser *versus* HCVcc (JFH1) infection of human hepatocytes and Huh7.5 cells.

<sup>1</sup> Molina, S., *et al.* (2007) *J. Hepatol.* 46, 411-419.

<sup>2</sup> Molina, S., *et al.* (2008) *J. Virol.* 82, 569-574.

## **IDENTIFICATION DE DEUX KINASES CELLULAIRES IMPLIQUEES A LA FOIS DANS L'ENTREE ET LA REPLICATION DU VHC**

Maud Trotard (1,2,3) ; Charlotte Lepère (1,2,3) ; Philippe Gripon (1,2,3) et Jacques Le Seyec (1,2,3)

(1) Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Unité 522, Rennes, France ; (2) Equipe Associée SERAIC, Université de Rennes 1, Rennes, France ; (3) Université de Rennes 1, Génomique Fonctionnelle Agronomie et Santé IFR 140, Rennes, France.

Dans l'objectif de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes pour le traitement des hépatites virales C nous avons recherché à identifier des facteurs cellulaires nécessaires au virus. Dans ce cadre, nous avons analysé l'impact de l'extinction individuelle de gènes par ARN interférence sur la susceptibilité de cellules à l'infection par le VHC. L'utilisation d'une banque siRNA nous a ainsi permis d'évaluer 122 gènes cellulaires impliqués dans le trafic et le remodelage membranaire. Le criblage a été réalisé à l'aide du modèle d'infection *in vitro* des cellules Huh7.5.1 par les VHCpp (pseudo-particules virales recombinantes dont l'infectivité dépend des protéines d'enveloppe du VHC). Ce crible a non seulement permis de compléter les données obtenues sur la voie d'entrée du virus qui s'effectue par voie d'endocytose dépendante de la clathrine mais aussi d'identifier une kinase cellulaire dont l'extinction protège les cellules d'une infection par le VHCpp ou le VHCcc (particules virales complètes recombinantes produites *in vitro*). A l'aide d'expériences complémentaires exploitant le système du réplicon et en analysant les différents membres de la famille à laquelle appartient cette kinase, nous avons pu identifier 2 nouvelles protéines cellulaires dont la présence est nécessaire à la fois à l'entrée et à la réplication du virus dans la cellule hôte.

## **ROLE DES GLYCANES DANS LES FONCTIONS DE PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHC**

François Helle (1) ; Laure Elkrief (1) ; Gabrielle Vieyres (1) ; Sandrine Castelain (2) ; Gilles Duverlie (2) ; and Jean Dubuisson (1)

(1) Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Université Lille I & II and Institut Pasteur de Lille, Lille, France;

(2) Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, Amiens, France;

Les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C (VHC) sont fortement glycosylées avec généralement quatre et onze sites de glycosylation sur E1 et E2 respectivement. En utilisant des particules rétrovirales pseudotypées avec les protéines d'enveloppe du VHC (VHCpp), des études récentes ont mis en évidence le rôle majeur joué par ces glycanes dans le repliement des protéines d'enveloppe, dans l'étape d'entrée du VHC et dans la protection contre les anticorps neutralisants. Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des glycanes associés à E1E2 en utilisant un génome dérivé de la souche JFH1 qui permet une bonne amplification du VHC en culture cellulaire (VHCcc). Nous avons analysé l'effet de la mutation des sites de glycosylation en terme d'expression des protéines d'enveloppe, de sécrétion des particules virales, d'infectiosité ainsi que de sensibilité aux anticorps neutralisants et à une forme soluble de CD81. Nos résultats indiquent que les glycanes sont importants pour le cycle viral du VHC et contribuent à l'échappement du VHC vis à vis de la réponse immunitaire humorale. Cependant, bien que des fonctions similaires soient affectées pour certains mutants, l'utilisation du système VHCcc nous a permis de mettre en évidence des différences par rapport au système VHCpp. Ces différences sont probablement liées au mode d'assemblage de ces deux types de particules.

## **HEPATITIS C VIRUS ENTRY IS A VIABLE TARGET FOR PREVENTION OF RE-INFECTION IN LIVER TRANSPLANTATION**

Samira Fafi-Kremer (1,2,3); Isabel Fofana (1,2); Patric Carolla (1,2); Eric Soulier (1,2); Evelyne Schvoerer (1,2,3); Arvind H. Patel (4); François-Loïc Cosset (5); Patrick Pessaux (6); Michel Doffoël (7); Philippe Wolf (6); Françoise Stoll-Keller (1,2,3); and Thomas F. Baumert (1,2,7).

(1) Inserm U748, Strasbourg

(2) Université Louis Pasteur, Strasbourg

(3) Institut de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

(4) MRC Virology Unit, Institute of Virology, University of Glasgow, Glasgow, UK

(5) Inserm, U758, ENS Lyon

(6) Service de Chirurgie Générale et Transplantation Multiorganes, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg

(7) Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg

End-stage liver disease due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause for liver transplantation (LT). HCV re-infection of the graft is universal and characterized by accelerated progression of liver disease. In this study, we used a retroviral HCV pseudoparticle (HCVpp) model system and human hepatocytes to investigate the molecular mechanisms of HCV re-infection of the liver graft in three patients undergoing LT. We demonstrate that viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are key determinants for the selection of HCV variants re-infecting the graft during the first days post transplantation. A monoclonal antibody directed against the viral envelope glycoprotein E2 efficiently neutralized patient-derived HCVpp that were resistant to the autologous host neutralizing responses. These results suggest that viral entry is a viable target for prevention of HCV re-infection of the liver graft.

## **CHARACTERIZATION OF THE MEMBRANE FUSION PROPERTIES OF CELL CULTURE-PRODUCED HEPATITIS C VIRUS PARTICLES**

Sibylle HAID, Thomas PIETSCHMANN\*, Eve-Isabelle PECHEUR\*

\* equal contribution

Enveloped viruses fuse their membrane with a host cell membrane, thereby releasing their genome into the cytoplasm and initiating the viral replication cycle.

To better understand the molecular features of HCV membrane fusion, we developed an in vitro fusion assay, relying on the use of cell culture-produced HCV (HCVcc) and on fluorescently-labeled liposomes. With this model system, we showed that HCV-mediated fusion could occur in a receptor-independent manner but within a specific pH range. Fusion depended on the viral dose and on the lipid composition of the target liposome membrane. Indeed cholesterol together with sphingomyelin exerted a synergistic effect on HCV fusion. Interestingly, when assaying the fusion properties of HCVcc particles with different buoyant density, we noted increased fusogenicity of particles with low density. This could be attributed to inherently different properties of the low density particles, to association of these particles with factors stimulating fusion or to cofloatation of factors enhancing fusion activity in trans.

Finally HCV fusion was inhibited in a dose-dependent manner by arbidol, a broad-spectrum antiviral compound shown by us to block HCV cell entry.

Taken together, these data point to a prominent role of lipids of both target and viral membranes in HCVcc-mediated fusion, and reveal an unexpected behaviour of HCVcc of different densities with regard to fusion. This is currently under investigation, in particular in the context of the fusion inhibition obtained with arbidol. This could pave the way for further studies aimed at combating HCV infection at the early steps of virus entry.

# **ANALYSE DES DETERMINANTS D'ENTREE VIRALE PORTES PAR LES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VIRUS DE L'HEPATITE B**

Yann Leduff, Camille Sureau  
INTS, Paris

## Introduction :

Le virus de l'hépatite B (HBV) porte trois types de protéines d'enveloppe : la petite (S), la moyenne (M) et la grande (L). A ce jour, deux déterminants du caractère infectieux (D1 et D2) ont été localisés sur ces glycoprotéines. D1 correspond aux 75 premiers résidus de la partie N-terminale de la région preS1 de L, et il peut être arbitrairement divisé en 3 sous-domaines (D1.1, D1.2 et D1.3). D1.1 est constitué de l'acide myristique lié au résidu glycine en position 2. D1.2 est porté par la région 2-48 et serait le site d'attachement à un récepteur encore inconnu. D1.3, dont on ignore encore la fonction, comprend les résidus 49-75. D2 a été récemment identifié par la laboratoire dans la boucle antigénique (BAG) commune aux trois protéines de surface. Il serait étroitement lié au réseau de ponts cystéines qui structurent cette région et qui définissent le déterminant antigénique « a » commun à tous les génotypes HBV.

## Description :

Dans cette étude, des protéines S portant des lésions de D2 et des protéines L portant des lésions de D1 et D2 ont été exprimées à la surface du virus de l'hépatite delta (HDV).

Des tests d'infection in vitro ont alors démontré que i) D1 et D2 ne sont pas nécessairement portés par une même molécule L pour être fonctionnels et ii) des particules présentant des protéines L de type sauvage et des protéines S dépourvues de D2 perdent leur caractère infectieux. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une implication de D2 lors d'une étape de désassemblage de l'enveloppe virale après internalisation.

De plus, à l'aide de protéines L présentant des lésions respectivement sur les domaines D1.1, D1.2 et D1.3, nous avons démontré que ces domaines doivent être portés par la même protéine L pour conserver le caractère infectieux. Ces résultats suggèrent une coopération étroite de ces 3 sous-déterminants lors des étapes précoces de l'entrée virale, en particulier dans l'attachement au récepteur.

## Conclusion :

Notre étude montre que les protéines d'enveloppe HBV contiennent deux déterminants d'entrée virale, D1 et D2, fonctionnellement séparables : D1 porterait le site d'attachement à un récepteur primaire alors que D2 serait engagé à une étape plus tardive, dans une interaction avec un récepteur secondaire ou dans une fonction de désassemblage de l'enveloppe après attachement.

## **L'ETABLISSEMENT DE L'INFECTION, LA REPLICATION ET LA PROPAGATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C SERIQUE (HCVSP) DEPENDENT DE L'ETAT DE PROLIFERATION /DIFFERENCIATION DES CELLULES HEPARG HUMAINES PROGENITRICES DU FOIE**

Infection settling, replication and propagation of serum hepatitis C virus particles (HCVsp) depend on the proliferation/differentiation stage of human HepaRG liver progenitor cells.

Ndiémé Ndongo (1,2) ; Sylvie De Sequeira (1,2) ; Simone Peyrol (2) ; Christian Trépo (1,2,3) ; Marie-Anne Petit (1,2)

(1) INSERM, U871, BIO-Optisis, 27 chemin des peupliers, 69570 Dardilly, France

(2) Université Lyon 1, IFR62 Lyon-Est, 69008 Lyon, France

(3) Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, 69002 Lyon, France.

Human HepaRG cells are liver progenitor cells which display potent ability of differentiation into functional and polarized hepatocytes. Therefore, we investigated their potential to support infection by Hepatitis C virus (HCV). The viral infection was performed using HCV particles (genotype 3a) purified from serum of infected patient (HCVsp) when the cells proliferated and exhibited a dedifferentiated, depolarized epithelial phenotype (day-3 after plating). Extra-cellular HCV RNA (+) and E1E2 surface antigen were detected as newly secreted HCV particles from day-21 to day-63 after plating with maximum at days 28-49 post-infection when the HepaRG cells have acquired the mature hepatocyte phenotype. In contrast, HCV infection settling required cellular growth. By immunohistological staining, E1E2 and core antigens were specifically detected in the HCVsp-infected HepaRG cells (HCVsp-RG cells) at day-31 (around 50-60% of cells) until day-56 (around 30% of cells) post-infection. The HCVsp-RG cells freezed at day-56 post-infection were then re-seeded at low-cell density. After 1 to 3 passages, the differentiation process was induced and HCV replication was assessed. Extra-cellular HCV RNA (+) was detected from day-28 to day-56 after plating in the HCV particles from concentrated supernatants of infected cultures. Upon differentiation of HCVsp-RG cells, electron microscopy and immunogold labeling were performed for morphological studies and subcellular localization of HCV structural proteins. In conclusion, we demonstrated that the human HepaRG cells are susceptible to HCV infection at the proliferative stage, and able to replicate and propagate the virus at the differentiated stage.

# ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES MEMBRANES CELLULAIRES ASSOCIEES AUX COMPLEXES DE REPLICATION DU VHC

Pauline Ferraris, Emmanuelle Blanchard, Sylvie Trassard & Philippe Roingeard.  
INSERM U966, Université François Rabelais & CHRU de Tours.

Comme pour la plupart des virus à ARN, le VHC induit des remaniements membranaires appelés *membranous web* et les protéines non structurales virales formant le complexe de réplication du virus sont associées à ces membranes remaniées. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons obtenu des clones cellulaires hébergeant des réplicons subgénomiques de la souche JFH-1, une souche hautement répliquative du VHC. L'analyse ultrastructurale de ces cellules a montré la présence de vésicules pourvues de membranes épaisses, très denses aux électrons, ainsi que des structures multivésiculaires, plus rares et plus discrètes. Ces cellules ont ensuite été soumises à un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation en gradient de sucrose, et les fractions collectées ont été analysées par western blot et par microscopie électronique en coloration négative. Les fractions présentant une densité de 1.15 à 1.22 g/cm<sup>3</sup>, positives pour les protéines non structurales NS3 et NS5A, ont montré en coloration négative des vésicules à membrane épaisse, ainsi que des structures multivésiculaires, non détectées dans le fractionnement des cellules témoins. Ces structures spécifiques présentent des similitudes avec celles observées pour d'autres virus à ARN, comme les poliovirus ou les coronavirus. Des immunomarquages en microscopie électronique, ainsi que des analyses d'imagerie confocale, sont en cours pour préciser la localisation des protéines non structurales et l'ARN viral dans ces différentes structures subcellulaires.

Par ailleurs, des études récentes ont montré un lien entre l'infection par le VHC et l'induction d'un mécanisme autophagique, comme c'est le cas pour d'autres virus à ARN. La formation de vésicules autophagiques est associée à la conversion de la protéine LC3 (protéine résidente du réticulum endoplasmique), en une forme clivée de la protéine appelée LC3-II. L'analyse de nos fractions riches en protéines NS3 et NS5A a montré que ces fractions étaient également riches en protéine LC3-II, suggérant que les membranes associées aux complexes de réplication du VHC seraient des membranes induites par un processus autophagique. A terme, une meilleure connaissance du complexe de réplication du VHC et de ses partenaires cellulaires associés pourrait permettre de concevoir de nouvelles stratégies antivirales contre ce virus.

## **GBF1 UN NOUVEAU FACTEUR CELLULAIRE NECESSAIRE POUR LA REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C**

Lucie Goueslain, Khaled Alsaleh, Pauline Horellou, Czeslaw Wychowski, Jean Dubuisson, Yves Rouillé

*Laboratoire hépatite C, UMR 8161 CNRS - Universités de Lille 1 et de Lille 2 - Institut Pasteur de Lille*

Les différentes étapes du cycle intracellulaire du virus de l'hépatite C (VHC) se déroulent en association étroite avec des membranes de la cellule hôte. La dynamique de nombreuses membranes cellulaires est coordonnée par plusieurs familles de GTPases. En particulier, les GTPases de la famille ARF régulent des remaniements membranaires impliqués dans des événements de transport dans les voies de sécrétion et d'endocytose.

Pour évaluer le rôle des membres de la famille ARF dans l'infection par le VHC, nous avons utilisé la bréfeldine A (BfA), qui bloque spécifiquement l'action de ces GTPases. Nos résultats montrent que cette drogue inhibe l'infection dans le système VHCcc mais pas dans le système VHCpp, indiquant qu'une étape du cycle infectieux postérieure à l'entrée est affectée. Des études de cinétique d'action de la drogue nous ont permis de confirmer que l'inhibition intervenait bien lors d'une étape post-entrée du cycle infectieux des VHCcc. Des expériences complémentaires ont suggéré que l'étape de réplication était inhibée.

Le rôle des ARFs au cours de l'infection par le VHC a été confirmé à l'aide de siRNA. Plutôt que de cibler individuellement les GTPases elles-mêmes, dont les fonctions sont redondantes, nous avons ciblé leurs activateurs, des protéines appelées facteurs d'échange nucléotidique (*Guanine nucleotide Exchange Factor*, GEF). Nous avons réalisé des expériences d'interférence à l'ARN ciblant les trois GEFs sensibles à la BfA et nous avons observé que seule la déplétion en l'un d'entre eux, appelé GBF1, inhibait l'infection par le VHC. Ces résultats ont été complétés avec des expériences de surexpression de formes mutées dominant-négatives de la GTPase ARF1, qui ont également conduit à une inhibition de l'infection par le VHC.

Nos résultats montrent donc que la réplication du VHC est inhibée par la BfA et que GBF1, un facteur cellulaire sensible à cette drogue, est nécessaire à l'infection par le VHC. Notre hypothèse est que la fonction de ce facteur d'échange nucléotidique de GTPases de la famille ARF pourrait être détournée lors des remaniements membranaires associés à la mise en place du complexe de réplication du VHC.

# INVESTIGATING THE ROLE OF THE N-TERMINAL BASIC REGION OF THE HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN IN VIRAL REPLICATION

Zuzanna Makowska, Roland Ivanyi-Nagy and Jean-Luc Darlix

LABORETRO, UNITE de VIROLOGIE HUMAINE INSERM 758, IFR 128  
Ecole Normale Sup\_rieure de Lyon, 46 all\_e d'Italie, 69 364 Lyon, FRANCE.  
Email: jldarlix@ens-lyon.fr

Hepatitis C virus (HCV) core protein is a major structural component of the viral particle and is involved in several key viral processes [1]. Moreover, HCV core can impact on the physiology of the infected cell [1]. The core protein was found to act as a potent RNA chaperone and to promote dimerization of HCV genomic RNA via a conserved stem-loop structure in the 3'UTR [2]. Recent data show that the N-terminal basic region of core governs these viral RNA-protein interactions [3]. This basic region of core contains three clusters of well-conserved arginine and lysine residues. To investigate the role of these basic clusters we examined the influence of point mutations on viral RNA replication and virus dissemination in cell culture. We observed that mutating specific basic residues to neutral or acidic ones within the core basic clusters caused a drastic decrease in viral replication and dissemination. At the same time, similar arginine or lysine substitutions in the basic clusters showed slight or no effect on HCV replication or virus infectivity. These results suggest that specific residues within the basic clusters of the core protein play an essential role in HCV replication and dissemination. A mechanism illustrating the role of the basic clusters in genomic RNA replication will be presented and discussed.

Work supported by ANRS and by the European community.

1. Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007) "Replication of hepatitis C virus" *Nat Rev Microbiol* 5(6): 453-63.
2. Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, et al. (2004). "The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro." *Nucleic Acids Res* 32(8): 2623-31.

# STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE POLYMERASES VIRALES : UN CONTEXTE POUR LA COMPREHENSION DE LA REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C

S. Bressanelli (1)

(1) Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

La structure cristallographique de la polymérase du virus de l'hépatite C (HCV-NS5b) a été déterminée il y a presque 10 ans. Elle constituait alors la première structure d'une ARN-polymérase dépendante de l'ARN (RdRp). On manquait donc de recul sur ce qui dans cette structure pouvait relever d'éléments communs aux RdRps virales et de particularités de HCV-NS5b. L'explosion des données cristallographiques dans les années 2000 a conduit à une situation diamétralement opposée : on dispose à présent de tant de données structurales sur les RdRps qu'il nous est apparu opportun de recenser ces données et de réévaluer à leur lumière la structure de HCV-NS5b. Ces nouvelles données peuvent être divisées en deux classes : tout d'abord, de nombreuses structures de HCV-NS5b en complexe avec des petites molécules ; en second lieu, des structures de RdRps d'autres virus à ARN. Pour ces dernières, trois catégories méritent particulièrement l'attention.

Des structures de complexes d'initiation sont à présent connues pour deux RdRps (de virus à ARN double brin). Ces travaux permettent de dégager les principes généraux qui gouvernent l'initiation *de novo*, mode d'initiation propre à certains virus à ARN, dont le HCV.

Des structures de complexes d'élongation sont disponibles pour deux familles de virus à ARN positif : les *Picornaviridae* à travers l'exemple du virus de la fièvre aphteuse, et depuis peu les *Caliciviridae* avec le norovirus. Il est particulièrement intéressant de comparer ces deux virus proches, car leurs polymérases, très semblables, utilisent toutes deux un mode d'initiation par amorce protéique très différent de celui du HCV. Pourtant, la polymérase du norovirus est un cas hybride car elle est également capable d'initiation *de novo*.

Enfin, sont apparues des structures de RdRps de virus proches du HCV, au sein de la même famille des *Flaviviridae* : la NS5 des flavivirus et la NS5b des pestivirus. Ces structures apportent la dernière touche à l'éclairage nouveau de la structure de HCV-NS5b, particulièrement les éléments impliqués dans l'initiation.

Nous discuterons les implications de l'ensemble de ces données pour HCV-NS5b, et notamment les effets possibles des inhibiteurs non nucléosidiques de cette enzyme.

# **CARACTERISATION STRUCTURALE DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE LA POLYMERASE DU VIRUS DE L'HEPATITE C: ROLE DU CONNECTEUR A L'ANCRE TRANSMEMBRANAIRE**

D. Harrus (1) ; L. Beaurepaire (1) ; N. Scrima (1) et S. Bressanelli (1)

(1) Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

L'ARN polymérase dépendante de l'ARN NS5b est une cible de choix pour des inhibiteurs spécifiques du virus de l'hépatite C (HCV). Le laboratoire travaille depuis plusieurs années à sa caractérisation structurale, précisant une hypothèse principale : l'inhibition et l'activation de la fonction polymérase sont étroitement liées à la partie C-terminale de la molécule (connecteur de 40 résidus + ancre transmembranaire de 21 résidus). En effet, la position du connecteur dans la crevasse catalytique serait critique pour l'initiation de la synthèse d'ARN ; son départ de cette crevasse conduirait à une ouverture de NS5b (et sans doute un repositionnement par rapport à la membrane) qui permettrait l'élongation du brin d'ARN néosynthétisé.

Nous utilisons principalement deux méthodes biophysiques pour l'étude structurale des changements de conformations de NS5b et du rôle régulateur joué par sa partie C-terminale : la cristallographie aux rayons X qui donne une image statique à résolution atomique de la molécule et la diffusion centrale des rayons X (SAXS) qui permet l'étude dynamique en solution à plus basse résolution. Ces techniques nécessitant des protéines solubles, nous utilisons des constructions délétées de l'ancre transmembranaire.

Afin de préciser le rôle régulateur du connecteur, deux types de constructions sont utilisées : des délétions de 21 (d21, correspondant à la perte de l'ancre transmembranaire) et 47 (d47, correspondant à la perte d'une partie du connecteur et de l'ancre) des résidus C-terminaux.

Afin de relier nos informations au comportement du virus en culture cellulaire, nous travaillons sur les NS5b de plusieurs souches, notamment :

- la souche Con1, consensus de sous-type 1b, pour laquelle de nombreuses données en système réplicon sont disponibles, notamment l'apparition de mutants de résistance sous traitement antiviral et la « fitness » des variants ;
- la souche J4 de sous-type 1b, infectieuse chez le chimpanzé ;
- la souche JFH1 de sous-type 2a, seule souche connue à la fois infectieuse et capable de se répliquer efficacement en culture cellulaire ;
- la souche J6 de sous-type 2a, infectieuse chez le chimpanzé, très voisine de JFH1 et pourtant incapable de se répliquer efficacement en culture cellulaire.

Nous disposons de résultats de cristallographie et/ou de SAXS pour J4-NS5b et JFH1-NS5b. Nous travaillons à présent à acquérir les données manquantes, notamment pour les deux autres souches. Nous présenterons les conclusions qu'on peut tirer sur les spécificités des polymérases de ces souches grâce à la combinaison de ces deux méthodes.

# **HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN IS A SUBSTRATE FOR THE PEPTIDYL-PROLYL CIS/TRANS ISOMERASE ACTIVITY OF CYCLOPHILINS A AND B**

Xavier Hanoullet†, Aurélie Badillo, Jean-Michel Wieruszeski†, Dries Verdegem†, Isabelle Landrieu†, Ralf Bartenschlager\*, François Penin & Guy Lippens†

From the Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France, the Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, CNRS, Université de Lyon, IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, F-69397 Lyon, France and the Department of Molecular Virology, University of Heidelberg, INF 345, D-69120 Heidelberg, Germany.

We report a biochemical and structural characterization of domain 2 of the non-structural 5A protein (NS5A) from the Hepatitis C virus (HCV) and also the results of interaction assays with cellular Cyclophilins. Gel filtration chromatography, circular dichroism spectroscopy and finally NMR spectroscopy all indicated the natively unfolded nature of this polypeptide. Because mutations in this domain have been linked to CsA resistance, we used NMR spectroscopy to investigate the relationship between this domain 2 of HCV NS5A and different cellular Cyclophilins (Cyp). We found a direct molecular interaction between NS5A-D2 and both Cyclophilin A and B, with a stronger affinity for CypA, and mapped the interaction surface on both molecular partners. Moreover, using NMR heteronuclear exchange spectroscopy, we showed for the first time direct evidence that NS5A-D2 is a valid substrate for the enzymatic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) activity of CypA and CypB.

## **ROLE DE HBX DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE B DE LA LIGNEE HEPATOCYTAIRE HEPARG**

O Hantz (1) ; J Lucifora (1) ; E Robert (2) ; D Durantel (1) ; M Strubin(2) et F Zoulim (1)

(1) INSERM Unit 871, Molecular Pathobiology and New Treatments of Viral Hepatitis, 151 Cours Albert Thomas, 69003 Lyon, France et (2) Department of Microbiology & Molecular Medicine, C.M.U. / University of Geneva, Rue Michel-Servet, CH-1211 Geneve 4, Switzerland

La protéine régulatrice HBx du VHB est associée à de multiples fonctions transactivatrices de gènes viraux et cellulaires et elle affecte la viabilité et la prolifération des hépatocytes, notamment par son interaction avec la protéine DDB1 du complexe Cul4-ubiquitin ligase. Son rôle dans l'infection virale est considéré comme déterminant mais reste toujours à déterminer. Utilisant le système des HepaRG, seule lignée cellulaire infectable par le VHB, nous avons étudié l'infektivité de particules du VHB mutants, incapables de synthétiser la protéine HB (-) ou produisant une protéine HBx mutée (R96E) ne se liant plus à la protéine DDB1. Les virions sauvages ou mutés ont été produits par transfection de cellules HuH7 par des plasmides codant contenant le génome entier du VHB ou par transduction de cellules HepG2 à l'aide de baculovirus-HBV recombinants. Les particules virales produites ont été quantifiées par détection de l'ADN viral après immunoprécipitation avec un anti-corps HBs. Les cellules HepaRG différenciées ont été infectées avec des quantités égales de virions sauvages et mutés. En absence de gène HBx ou en présence de X (R96E), la réplication virale estimée par le taux d'antigène HBs excrété 12 jours après infection est diminuée de manière drastique (>95 %). Les formes d'ADN virales répliquatives sont indétectables pour les virions mutés alors que l'ADN viral superenroulé semble être présent. Des lentivirus exprimant HBx sauvage ou HBx (R96E) ont été transduits dans les cellules infectées 12 jours après infection. Seule, la trans-complémentation par HBx sauvage restaure partiellement la sécrétions d'antigène HBs par les cellules infectées par un virions HBx (-). Ces résultats qui restent à confirmer suggèrent que l'absence de HBx n'empêcherait pas la formation d'ADN superenroulé mais bloquerait son activité transcriptionnelle. Le phénotype du mutant HBx (R96E) indique en outre que l'interaction HBx-DDB1 jouerait un rôle important dans l'activation de l'ADN superenroulé.

## **TRANSACTIVATION OF THE HEPATITIS B VIRUS CORE PROMOTER BY THE NUCLEAR RECEPTOR FXR $\alpha$**

Ramière Christophe (1,2,3); Scholtès Caroline (1,2,3); Diaz Olivier (1,3); Icard Vinca (1,2,3); Perrin-Cocon Laure (1,3); Trabaud Mary-Anne (2); Lotteau Vincent (1,2,3); and André Patrice (1,2,3).

(1) INSERM U851, Lyon, F-69007, France

(2) Hospices civils de Lyon, Lyon, F-69002, France

(3) Université de Lyon, Université de Lyon1, IFR 128 BioSciences Lyon Gerland, Lyon, F-69007, France.

The Hepatitis B Virus (HBV) Core promoter activity is positively and negatively regulated by nuclear receptors, a superfamily of ligand activated transcription factors, via cis-acting sequences situated on the viral genome. In this study, we investigated the role of the Farnesoid X Receptor alpha (FXR $\alpha$ ) in modulating transcription from the HBV Core promoter. FXR $\alpha$  is a liver-enriched nuclear receptor activated by bile acids that recognizes Hormone Response Elements by forming heterodimers with the Retinoid X Receptor alpha (RXR $\alpha$ ). Gel retardation analysis demonstrated that FXR $\alpha$  /RXR $\alpha$  heterodimers can bind two sequences, on the HBV enhancer II and Core promoter regions, presenting high homology to the consensus AGGTCA inverted repeat FXR $\alpha$  Response Elements. In transient transfections of the human hepatoma cell line Huh-7, bile acids, through FXR $\alpha$ , enhanced the activity of a luciferase reporter containing the HBV enhancer II and Core promoter sequences. Moreover, using a greater-than-genome HBV construct, we showed that FXR $\alpha$  also increases synthesis of the 3.5 kb viral RNA. Together these results suggest that FXR $\alpha$  is another member of the nuclear receptor superfamily implicated in the regulation of the HBV Core promoter activity and that bile acids may play a role in the natural history of the HBV infection.

# **LE VIRUS DE L'HEPATITE C INDUIT LA FIBROSE HEPATIQUE SANS INFLAMMATION CHEZ DES SOURIS TRANSGENIQUES EXPRIMANT LA TOTALITE DU CADRE OUVERT DE LECTURE VIRAL**

Philippe Chouteau, Emilie Mérour, Hervé Lerat et Jean-Michel Pawlotsky

INSERM U841, Créteil

La fibrose hépatique est une caractéristique fréquente de l'infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC). L'activation de la fibrogenèse semble principalement liée à la réaction inflammatoire locale. Cependant, le rôle direct du VHC dans le processus fibrogène reste inconnu. Notre hypothèse est que la fibrose peut être au moins en partie directement induite par le VHC, indépendamment de la réponse immune de l'hôte.

Nous avons utilisé le modèle murin transgénique (lignée FL-N/35) exprimant le cadre de lecture ouvert complet du VHC. Ce modèle permet l'expression de la totalité des protéines du VHC à un niveau proche de celui rencontré au cours de l'infection, sans production virale ni réponse immune antivirale. Les souris transgéniques pour le cadre de lecture ouvert du VHC de plus de 13 mois, en particulier les mâles, développent une stéatose microvésiculaire sévère et dans un tiers des cas, des cancers primitifs du foie (CHC). Un dépôt en excès de la matrice extra-cellulaire et une activation des cellules étoilées du foie ont été trouvés dans les tissus tumoraux. Par ailleurs, une activation des cellules étoilées du foie a été constatée dans le tissu non tumoral de 75% des souris ayant développé un CHC et chez 30% des souris n'en ayant pas développé, mais chez aucune souris témoin non transgénique. Afin d'étudier le rôle de l'expression des protéines du VHC dans l'induction de la fibrose en présence d'autres paramètres fibrogènes, nous avons étudié 2 groupes de souris, constitués chacun pour moitié de souris transgéniques et de souris non transgéniques. Les deux groupes étaient composés de souris non soumises à des agents fibrogènes et de souris ayant reçu des injections à doses croissantes de l'agent fibrosant CCl<sub>4</sub>. Les coupes hépatiques de ces souris ont été colorées au picosirius, qui révèle spécifiquement le dépôt de fibres, et l'expression d'ARNm de marqueurs de la fibrose a été quantifiée par RT-qPCR. Les animaux non transgéniques du groupe traité par le CCl<sub>4</sub> ont développé une fibrose nette en score METAVIR, contrairement aux animaux témoins non transgéniques non traités. La sévérité de la fibrose était cependant plus importante dans le groupe de souris transgéniques traitées au CCl<sub>4</sub> par rapport aux animaux non transgéniques traités. Les animaux non transgéniques du groupe traité par le CCl<sub>4</sub> présentaient une augmentation nette des messagers du collagène 1 $\alpha$ (I) et du TGF $\beta$  comparée aux animaux témoins non transgéniques non traités. Cette augmentation était très largement potentialisée chez les souris transgéniques traitées au CCl<sub>4</sub>, suggérant un effet synergique de l'expression des protéines du VHC sur l'effet fibrosant du CCl<sub>4</sub>.

En conclusion, l'expression des protéines du VHC semble pouvoir induire le processus fibrogène et potentialiser l'effet fibrosant d'agents chimiques. Le VHC pourrait donc jouer un rôle propre non négligeable dans la progression de la maladie hépatique, indépendant de la réponse immune, mais potentialisant son effet.

# HEPATITIS C VIRUS MODULATES HEPATOCYTE APOPTOSIS BY TARGETING BID

Yannick Simonin (1); Paulette Bioulac-Sage (2); Stanley M. Lemon (3); and Urszula Hibner (1)

(1) University of Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire, CNRS UMR 5535, 1919 route de Mende, Montpellier, France

(2) CHU, Groupe hospitalier Pellegrin, Anatomie Pathologique, Place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France

(3) UTMB, 301 University Boulevard, Galveston, Texas, USA

## Objectives:

Modulation of the apoptotic response is frequently employed by viruses to escape the immune surveillance of the host. We have previously shown that Bid, a proapoptotic Bcl2 family member, is downregulated in hepatocytes of HCV-transgenic mice, leading to resistance to Fas-mediated apoptosis and increased persistence of experimental viral infections. We now report on molecular mechanisms of Bid downregulation and on their relevance for human disease.

## Methods:

Biochemical and genetic analyses were performed on cell lines harbouring HCV replicons and on liver biopsies from 40 patients diagnosed with hepatocellular carcinoma of diverse origins.

## Results:

Similarly to the transgenic model, Bid is down-regulated in the context of HCV-linked tumorigenesis in humans. In contrast to HBV-related HCC, 20% of HCV-linked tumours and 100% of the rare cases arising on non-cirrhotic livers, display low Bid levels. In the full-length HCV replicon setting, viral proteins target a calpain-like cellular protease that degrades the endogenous Bid. This protease appears frequently activated in the human tumours that display low Bid expression. Moreover, we have identified a class of pharmacological protease inhibitors that restore physiological levels of Bid. Finally, we were able to show that the viral NS5A protein is responsible for the anti-apoptotic phenotype we described. Interestingly, we detected major differences in the activity of various viral genotypes. Experiments are in progress to delineate the molecular bases of these differences.

## Conclusions:

HCV proteins activate a cellular protease which targets a pro-apoptotic protein Bid. As a consequence, the cells harbouring viral proteins become resistant to cell death signalling employed during T cell mediated immune response. This cellular protease might constitute a new molecular target useful in an effort to combat HCV infection.

## **ANALYSE ULTRASTRUCTURALE ET QUANTITATIVE DES REGROUPEMENTS DE GOUTTELETTES LIPIDIQUES INDUITS PAR LA PROTÉINE DE CORE DU VHC**

Marion Depla, Rustem Uzbekov, Christophe Hourieux & Philippe Roingear.  
INSERM U966, Université François Rabelais & CHRU de Tours.

Plusieurs travaux ont déjà montré que la protéine de capsid du VHC se localise en surface des gouttelettes lipidiques et qu'elle est capable d'induire un regroupement de ces gouttelettes dans une zone périnucléaire. Récemment, il a été suggéré que ce phénomène se produit par une redistribution des gouttelettes lipidiques pré-existantes dans le cytoplasme, via un trafic de ces organites le long des microtubules du cytosquelette, conduisant à leur regroupement autour du centrosome (Boulant *et al*, Traffic 2008). Cependant, notre équipe a mis au point une méthode de quantification des gouttelettes lipidiques montrant que celles-ci sont présentes en quantité plus importante dans une cellule produisant la protéine de core du VHC par rapport à une protéine contrôle comme la b-galactosidase (Hourieux *et al*, Gut 2007).

Ces divergences nous ont incitées à quantifier les gouttelettes lipidiques présentes dans des cellules produisant la protéine de core mature ou immature du VHC. En effet, seule la protéine mature, clivée par la signal peptide peptidase (SPP), est retrouvée à la surface des gouttelettes lipidiques. Il a été également montré qu'une protéine non-clivée ne peut pas induire ce regroupement des gouttelettes lipidiques. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle des cellules de mammifère BHK-21 exprimant avec un vecteur dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV) la protéine de core sauvage (efficacement clivée par la SPP) ou un mutant ASC180/3/4VLV (non clivé par la SPP). Une telle quantification a montré une quantité beaucoup plus importante de gouttelettes lipidiques dans des cellules produisant la protéine de core sauvage, comparé au mutant ASC180/3/4VLV ( $p = 0.0037$ ). Ceci suggère que la protéine de core du VHC induirait une synthèse accrue des gouttelettes lipidiques, plutôt qu'une simple redistribution intracellulaire de ces organites.

Par ailleurs, notre équipe a récemment mis au point un modèle de reconstruction 3D de microdomaines cellulaires en utilisant une approche de coupes sériées de microscopie électronique (Roingear *et al*, Histochem Cell Biol 2008). Nous avons mis à profit ce modèle pour reconstruire plusieurs cellules produisant la protéine de core sauvage. Ces reconstructions ont montré qu'il n'y avait pas de localisation préférentielle des regroupements de gouttelettes lipidiques au voisinage des centrosomes. Ceci suggère que ces regroupements pourraient être liés à une re-synthèse des gouttelettes au niveau de microdomaines membranes produisant la protéine de core du VHC. Un tel mécanisme pourrait s'expliquer par les propriétés des gouttelettes lipidiques d'effectuer des cycles dynamiques de fusion/fission avec les membranes du RE, démontrées par ailleurs.

Des travaux complémentaires, notamment avec le modèle du virus complet JFH1, restent à effectuer pour confirmer cette hypothèse. Le fait que la protéine de core du VHC pourrait augmenter la quantité des gouttelettes lipidiques plutôt que d'induire une simple relocalisation intracellulaire de ces organites revêt une importance au regard des mécanismes impliqués dans la stéatose hépatique viro-induite.

## N-TERMINAL UBIQUITINATION OF HEPATITIS B VIRUS X PROTEIN

Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M-A., and Neuveut, C.

Institut Pasteur, Laboratoire « Oncogénèse et Virologie Moléculaire »

28, rue du Dr. Roux

75015, Paris, France

The hepatitis B virus (HBV) induces acute and chronic liver diseases. Chronic hepatitis B is a major health problem with more than 50 % of hepatocellular carcinoma cases worldwide that are related to HBV infection. The virus encodes a multifunctional protein, called HBx, that is essential for virus replication and that is thought to contribute to hepatocarcinogenesis. Because of its critical role in virus replication and oncogenesis, it is important to understand the processes that regulate HBx activities. Recently, postranscriptional modifications such as acetylation, ubiquitination, sumoylation have been involved in regulating the activities of many proteins. In particular, ubiquitination is believed to possess signaling function that results in destabilization, altered trafficking and/or functional modulation of the target protein. With a half life of 20 minutes, HBx is a substrate of the proteasome complex and it has been shown to be ubiquitinated *in vivo*, meaning that it is targeted by E3 ubiquitin ligases. In this study, we examined the ubiquitination of HBx and its role on HBx activities. We observed that a lysineless HBx mutant is still targeted for degradation by the proteasome since it is stabilized when cells are treated with the proteasome inhibitor MG132. Moreover, this mutant is still ubiquitinated *in vivo*, arguing that HBx undergoes N-terminal ubiquitination. Interestingly, the lysineless HBx mutant loses its capacity to activate transcription but is still able to induce apoptosis, suggesting that mutation of internal lysines differently affects HBx activities. Using immunofluorescence, we confirmed that mutation of lysines does not affect HBx subcellular localization. We are currently investigating whether internal lysines are modified and in turn, how this might affect HBx transcriptional activity.

# **LE ROLE DU RETROTRANSPORT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE VERS LE CYTOPLASME DE LA PROTEINE PRECORE DU VIRUS DE L'HEPATITE B HUMAINE**

Marion Duriez, Jean-Michel Rossignol, Delphine Sitterlin

Laboratoire de Génétique et de Biologie Cellulaire, UMR 8159, CNRS / Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines.

Les déterminants viraux responsables de la persistance du virus de l'Hépatite B humaine (VHB) sont encore mal connus. Des données de la littérature indiquent que la protéine précore de ce virus pourrait être impliquée dans l'établissement de la persistance virale. Cette protéine est adressée au réticulum endoplasmique (RE) grâce à son peptide signal. Une fois celui-ci clivé, une protéine de 22 kDa (P22) est libérée dans la lumière du RE. Elle subira ensuite un clivage en C-terminal conduisant à la sécrétion de l'antigène HBe. De manière surprenante, une quantité non négligeable de P22 est retrouvée dans le cytoplasme. Nous avons récemment expliqué cette localisation particulière en démontrant que P22 quitte la lumière du réticulum endoplasmique (RE) en détournant la voie ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) puis échappe à la dégradation par le protéasome grâce à son faible nombre de lysines qui rend l'ubiquitinylation inefficace. Nous avons aussi observé que la protéine chaperon Grp78/BiP est présente dans la fraction cytoplasmique lorsqu'il y a un rétrotransport de P22 et que cette relocalisation de BiP est la conséquence d'une interaction spécifique entre P22 et BiP.

Nous nous intéressons désormais aux conséquences du réadressage de P22 sur la biologie du virus et plus précisément sur la persistance virale. BiP interagit directement avec les protéines membranaires responsables de l'activation de l'UPR (unfolded protein response) et les inhibe. Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, elles séquestrent BiP et la voie UPR est activée. Ainsi le rétrotransport de P22, en relocalisant BiP dans le cytoplasme, pourrait activer l'UPR. Les études sont en cours pour valider ou non cette hypothèse. D'autre part, il a été montré que la grande protéine d'enveloppe L du virus interagissait spécifiquement avec BiP. Cette interaction est nécessaire au bourgeonnement des particules virales au niveau du RE, première étape de la sécrétion virale par la voie exocytique. Dans ce contexte, nous envisageons que P22 puisse perturber l'association BiP/L et en conséquence le bourgeonnement des nucléocapsides virales. Etant donné que les capsides non enveloppées retournent dans le noyau, P22, indirectement, favoriserait le maintien de nombreux génomes dans le noyau de l'hépatocyte infecté et ainsi la persistance du VHB. Des expériences de co-immunoprécipitation en cellules de mammifères sont en cours pour étudier cette hypothèse.

## **HEPATITIS C VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN 2 DISTURBS THE SECRETORY PATHWAY AND ITS EFFECT IS COMPENSATED BY THE VIRAL ENVELOPE PROTEINS**

Nathalie Callens (1) ; Costin-Ioan Popescu (1,2) ; Fabien Van Coppenolle (3,4) ; David Delgrange (1) ; Czeslaw Wychowski (1) ; Natacha Prevarskaya (3) ; Yves Rouillé (1) ; Jean Dubuisson (1).

(1) Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Université de Lille I & II and Institut Pasteur de Lille, Lille, France

(2) Institute of Biochemistry, Bucharest, Romania

(3) INSERM U800, Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France

(4) Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR CNRS 5123, Université de Lyon I, Villeurbanne, France.

Viral proteins are known to alter the cellular machinery due to their functions in different steps of the virus life cycle. Hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 2 (NS2) is a multispinning transmembrane protein that was recently shown to be crucial in HCV assembly. The aim of our study was to analyze the NS2 subcellular localization and its effects on the secretory pathway separately or in the context of an HCV replicative clone. Using confocal microscopy, we showed that NS2 is localized exclusively in the endoplasmic reticulum. Calcium imaging indicated that NS2 expression increases the cytosolic calcium concentration in a genotype specific manner. The intracytosolic calcium augmentation correlated with the partial activation of the unfolded protein response with a block in the upregulation of endoplasmic reticulum chaperones. By analyzing disulfide bond formation and plasma membrane transport, we showed that folding of model proteins with large intraluminal ectodomains was impaired. We further brought evidence of an endoplasmic reticulum membrane stress caused by NS2 as its effect was mapped in its transmembrane region by using intergenotypic chimera of NS2. In the context of an HCV chimeric 1b-2a genome, the disturbance caused by NS2 alone was compensated by other viral components. Using deletion analysis, we identified the envelope glycoprotein heterodimer E1E2 as the viral compensatory element. We discuss the potential interactions of NS2 with the envelope protein(s) and the possible role of NS2 in membrane deformation during the viral assembly process.

## HEPATITIS C VIRUS INFECTION PROTEIN NETWORK

B. de Chassey (1,2); V. Navratil (2,3); L. Tafforeau (1,2); M. S. Hiet (1,2,9); A. Aublin-Gex (1,2); S. Agaugué (1,2,10); G. Meiffren (1,2); F. Pradezynski (1,2); B.F. Faria (1,2); T. Chantier (1,2); M. Le Breton (1,2); J. Pellet (1,2); N. Davoust (1,2); P. E. Mangeot (1,2); A. Chaboud (2,4); F. Penin (2,4); Y. Jacob (5); P.O. Vidalain (6); M. Vidal (7); P. André (1,2,8); C. Rabourdin-Combe (1,2); V. Lotteau (1,2,8)

(1) Inserm Unit 851, Lyon 69007, France.

(2) Université de Lyon, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, Lyon 69007, France.

(3) INRA, UMR754, rétrovirus et pathologie comparée, Lyon 69007, France.

(4) Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS, Lyon 69007, France.

(5) Unité Postulante de Génétique, Papillomavirus et Cancer Humain, Institut Pasteur, Paris 75724 Cedex 15, France.

(6) Laboratoire de Génomique Virale et Vaccination, CNRS URA 3015, Paris 75724 Cedex 15, France.

(7) Center for Cancer Systems Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston 02115, Massachusetts, USA.

(8) Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix-Rousse, Laboratoire de virologie, Lyon 69004, France.

(9) Present address: Department for Molecular Virology, University Heidelberg, Heidelberg 69120, Germany.

(10) Present address: Service de Recherches en Hémato-Immunologie, CEA-DSV-DRM, Hôpital Saint-Louis, IUH, Paris 75475, France.

A proteome-wide mapping of interactions between hepatitis C virus and human proteins was performed to provide a comprehensive view of the cellular infection. A total of 314 protein-protein interactions between HCV and human proteins was identified by yeast two-hybrid and 170 by literature mining. Integration of this dataset into a reconstructed human interactome showed that cellular proteins interacting with HCV are enriched in highly central and interconnected proteins. A global analysis based on functional annotation highlighted the enrichment of cellular pathways targeted by HCV. A network of proteins associated with frequent clinical disorders of chronically infected patients was constructed by connecting the insulin, Jak/STAT and TGF $\beta$  pathways with cellular proteins targeted by HCV. CORE protein appeared as a major perturber of this network. Focal adhesion was identified as a new function affected by HCV, mainly by NS3 and NS5A proteins.

## INHIBITION DRASTIQUE DE SECRETION DES HEPADNAVIRUS PAR UN PEPTIDE PERMEABILISANT

Fabien Abdul (1) ; Bénédicte Ndeboko (1) ; Thierry Buronfosse (1,2) ; Fabien Zoulim (1),  
Peter Nielsen (3), Michael Kann (4), Lucyna Cova (4)

(1) INSERM Unité 871, Lyon, France

(2) Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon, France

(3) The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

(4) CNRS UMR 5234 MCMP, Bordeaux, France

Les propriétés antivirales de certains peptides cationiques perméabilisants (cell penetrating peptides ou CPP) naturels ou synthétiques ont été montrées vis à vis de différents virus (HSV, HIV, influenza...) avec une action directe des CPP sur l'enveloppe virale. Dans la présente étude, un CPP modifié (P3) a été évalué, *in vitro*, pour son activité antivirale sur la réplication des hépadnavirus en utilisant le virus de l'hépatite B du canard (DHBV) comme modèle.

Des cultures primaires d'hépatocytes fœtaux de canards (PDH) ont été infectées par le DHBV et traitées avec P3 à différentes concentrations pendant 6 jours. Une lignée d'hépatomes transfectée stable par le DHBV (LMH-D2) a également été soumise au même traitement.

Un prétraitement du DHBV ou des PDH par le peptide P3 n'a pas affecté l'infection virale suggérant que le peptide P3 n'a pas d'effet direct sur le DHBV ou sur son entrée dans les cellules. Par contre, un traitement pendant 6 jours de PDH infectées par le DHBV a entraîné une inhibition dose-dépendante de la sécrétion virale conduisant à une diminution d'environ 90% du relargage viral par rapport aux contrôles non traités. L'inhibition de la sécrétion virale apparaît très rapide puisqu'elle a été observée dès les premières 24 h post-traitement. Le traitement des cellules LMH-D2 par P3 a montré un effet inhibiteur similaire sans entraîner de toxicité aux concentrations testées. La microscopie confocale a montré que le traitement des LMH-D2 par P3 conduit à une accumulation de la grande protéine d'enveloppe du DHBV suggérant un mécanisme d'altération de la morphogénèse virale. De plus, une inhibition de la sécrétion virale accompagnée d'accumulation des enveloppes virales a été observée lors du traitement par le P3 des cellules HepaRG infectés par l'HBV.

L'ensemble de ces résultats montre, pour la première fois, la capacité d'un peptide cationique modifié à inhiber rapidement et de façon drastique la sécrétion extracellulaire des hépadnavirus. Le CPP P3 n'affecte pas les étapes précoces du cycle de réplication du DHBV et l'HBV, mais altérerait des étapes tardives de la morphogénèse virale.

# **CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE MUTATION DE RESISTANCE (V36C) CHEZ UN PATIENT TRAITÉ AVEC UNE TRITHÉRAPIE DE TELAPREVIR, D'IFN-ALPHA 2A PEGYLE ET DE RIBAVIRINE**

Laetitia Barbotte (2) ; Abdelhakim Ahmed-Belkacem (2) ; Stephane Chevaliez (1,2) ; Alexandre Soulier (1,2) ; Doug Bartels (4) ; Yi Zhou (4) ; Andzej Ardzinski (4) ; Nagraj Mani (4) ; Govinda Rao (4) ; Christophe Hezode (2,3) ; Ann Kwong (4) ; Shelley George (4) ; and Jean-Michel Pawlotsky (1,2).

(1) French National reference Center for Viral Hepatitis B, C and delta, Department of Virology, Hospital Henri Mondor, Université Paris 12, Créteil, France

(2) INSERM U841, Créteil, France

(3) Department of Hepatology and Gastroenterology, Hospital Henri Mondor, Université Paris 12, Créteil, France

(4) Vertex Pharmaceuticals.

Le Telaprevir (VX-950, TVR, Vertex Pharmaceuticals) est un nouvel inhibiteur spécifique de la sérine protéase NS3 du virus de l'hépatite C. Une précédente étude clinique de phase I portant sur l'administration de telaprevir en monothérapie pendant 14 jours a montré l'émergence rapide de variants viraux résistants portant une ou plusieurs mutations (V36, T54, R155 et A156). Notre étude s'est appuyée sur le suivi à l'hôpital Henri Mondor de 20 patients inclus dans l'essai clinique de phase II (PROVE-2) évaluant l'efficacité du TVR en combinaison à l'IFN-alpha 2a pegylé (Peg-IFN) en présence ou en absence de ribavirine (RBV). Nous avons réalisé une étude détaillée de la dynamique d'évolution des quasi espèces chez les patients non répondeurs et rechuteurs et caractérisé une nouvelle substitution amino acide à une position de résistance connue (V36C).

Parmi les 6 patients recevant une combinaison de TVR + Peg-IFN-alpha 2a sans ribavirine, 3 patients infectés par un virus de génotype 1a ont conservé une charge virale positive durant le traitement et 3 patients (1 patient infecté par un virus de génotype 1a et deux patients infectés par un virus de génotype 1b) ont présenté une charge virale indétectable (< 30 UI/ml) durant le traitement mais rechuté après l'arrêt du traitement. Chez tous ces patients, en plus des mutations de résistances connues, plusieurs mutations additionnelles ont été identifiées (R26K, A40T, T42S, Y56F, T91A, G174S). Une modélisation moléculaire du TVR fixé au site catalytique de la protéase suggère qu'aucune de ces mutations additionnelles n'interfère directement avec la fixation du TVR. Aucune des mutations additionnelles testées seules (T42S en cours) dans le modèle du réplicon subgénomique, ne confère un changement significatif de sensibilité au TVR. Il est possible que ces mutations interfèrent indirectement avec la fixation du TVR et/ou augmentent les capacités répliquatives des variants.

Parmi les 9 patients recevant une combinaison de TVR + Peg-IFN-alpha 2a + ribavirine, 7 patients ont présenté une réponse virologique soutenue et 2 patients ont présenté une charge virale indétectable (< 30 UI/ml) durant le traitement mais ont rechuté après l'arrêt du traitement. Une nouvelle substitution amino acide à une position de résistance connue (V36C) a été observée chez un des patients rechuteurs. La protéase issue de la séquence du patient a été purifiée. Cette nouvelle mutation conférait *in-vitro* un niveau de résistance comparable aux variants résistants connus (V36L et V36M). Les paramètres cinétiques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) étaient comparables aux valeurs obtenues pour la protéase sauvage, suggérant que cette mutation n'affecte pas drastiquement l'activité protéasique de NS3. Les variants V36L, V36M, V36C présentaient des niveaux de résistance respectifs de 2.5, 7 et 8.6 fois l'IC50 du virus sauvage dans le système du réplicon subgénomique.

*In silico*, l'augmentation de la flexibilité de la Phe 43, due à la perte d'interaction avec la V36, semble diminuer son interaction avec le TVR et affecter la liaison hydrogène entre la sérine catalytique (S139) et la chaîne latérale de la Leu 44, perturbant ainsi la liaison de covalence du TVR avec le S139. La grande barrière génétique de la mutation V36C (3 mutations nécessaires à l'obtention d'un codon Cys) explique sa faible fréquence d'apparition. Le mutant V36C possède un fitness répliatif semblable à celui observé pour le phénotype sauvage qui expliquait la persistance du mutant V36C 76 semaines après l'arrêt du traitement chez notre patient.

## **EFFET ANTIVIRAL DU BAY 41-4109 DANS UN MODELE ANIMAL HUMANISE ET INFECTE PAR LE VHB: LA SOURIS ALB-UPA/SCID**

N. Brezillon, MN. Brunelle, C. Lamant, L. DaSilva, G. Puerstinger, O. Hantz, J. Belghiti, L. Hannoun, D. Kremsdorf

INSERM 845, Paris

Introduction et but du travail: Les traitements actuels de l'hépatite B chronique reposent sur l'administration d'interférons alpha ou d'analogues de nucléosides. Malheureusement ces molécules ne sont pas efficaces chez tous les patients, elles peuvent générer des effets secondaires et conduire à l'émergence de souches virales résistantes. Le BAY 41-4109 est un membre de la famille des heteroaryldihydropyrimidines qui a été montré comme inhibiteur de la réplication du virus de l'hépatite B via la déstabilisation de l'assemblage de la capsid virale. Le but de notre travail était d'évaluer la capacité antiviral du BAY 41-4109 dans le modèle de souris Alb-uPA/SCID.

Méthodes: Les souris Alb-uPA/SCID sont humanisées par l'injection intra splénique d'hépatocytes humains. Les animaux dont le foie est repeuplé de manière efficace par les hépatocytes humains sont identifiés par la quantification du niveau d'albumine humaine sérique. Une production virale de VHB à été obtenu par la concentration du surnageant de cellules HepG2215 et à été utilisée pour infecter les souris humanisées par inoculation intra péritonéale du virus. La quantité de virus présent dans le sérum des souris modèles à alors été évaluée par PCR quantitative. Les souris infectées ont été traités par gavage à l'aide d'une suspension de tylose contenant le BAY 41-4109 (15mg/kg) ou par le tylose uniquement (control). Ce traitement à été fait deux fois par jour entre les jours 10 (j10 a.i.) et 15 (j15a.i.) après infection.

Résultats: Comme la concentration d'albumine humaine sérique était stable tout au long du traitement, le composé ne semble pas avoir d'effet cytotoxique sur les hépatocytes humains au bout de 5 jours de traitements. Nous avons comparer les virémies des souris traitées par la molécule antivirale à j10 a.i., j15a.i. et j20a.i. aux virémies des souris contrôles. En comparaison à la valeur de virémie mesurée à j10a.i. et à j15a.i. (n=8) les souris traitées présentent une diminution par un facteur 3 de la virémie quant les contrôles (n=3) montrent une augmentation de 4 fois (p<0.005). A j20 a.i., et toujours en comparaison à la valeur à j10 a.i. les animaux traité (n=9) présentent une faible diminution par un facteur de 0.9 quant les contrôles (n=4) présentent une forte augmentation de la virémie (facteur 24 d'augmentation (p<0.005)).

Conclusions: Le BAY 41-4109 présente un effet antiviral contre le VHB dans le contexte de la souris Alb-uPA/SCID au foie humanisé. Cette molécule pourrait devenir une solution pour traiter les patients chroniquement infectés par le VHB qui échappent aux traitements actuels.

## **REACTIVATION SOUS L'ASSOCIATION FLUTICASONE-RITONAVIR D'UNE INFECTION A VHB OCCULTE CHEZ UN PATIENT ANTI-HBS+ ET CO-INFECTE PAR LE VIH**

Nora MARTEL (1) ; Laurent COTTE (1,2) ; Christian TREPO (1,2) ; Fabien ZOULIM (1,2) ;  
Alan KAY (1)

(1) INSERM, U871, Lyon

(2) Service d'Hépatogastroentérologie, Hôtel Dieu, Lyon

Un patient de 57 ans est suivi depuis 1995 pour une infection VIH au stade de SIDA. Il était considéré comme guéri vis-à-vis de l'hépatite B, étant anti-HBc<sup>+</sup> et anti-HBs<sup>+</sup>. Il était en situation d'échec virologique pour le VIH en raison d'une mauvaise observance du traitement antirétroviral qui comportait en 2006 Saquinavir, Lopinavir-Ritonavir et Abacavir. Le patient était également suivi pour un trouble ventilatoire obstructif pour lequel un traitement par Fluticasone et Triamcinolone (glucocorticoïdes) avait été introduit fin 2006. Fin mai 2007, le patient était hospitalisé en raison d'un ictère et d'une cytolysse > 50N. Les CD4 étaient à 332/mm<sup>3</sup> et la charge virale VIH fortement positive à 5,3x10<sup>5</sup> copies/ml, le traitement antirétroviral ayant été arrêté au début de l'ictère. La sérologie VHB montre la réapparition de l'AgHBs et de l'AgHBe malgré la persistance d'anticorps anti-HBs à titre élevé (> 400 UI/L). L'ADN VHB était fortement positif, >10<sup>6</sup> copies/ml. Le patient était négatif pour le VHC et le VHD. Le bilan étiologique ne retrouve pas d'autre origine à la cytolysse que la réactivation du VHB. Le Fluticasone était interrompu et le traitement antirétroviral était remplacé par l'association Lopinavir-Norvir, Tenofovir, Emtricitabine, Enfuvirtide. Sous ce traitement, l'ADN du VHB devenait indétectable en 6 semaines et une séroconversion anti-HBe était obtenue en 8 semaines. L'infection VIH est actuellement contrôlée avec une charge virale VIH < 50 copies/ml et des lymphocytes CD4 voisins de 200/mm<sup>3</sup>. Nous avons amplifié des génomes entiers de VHB à partir du seul sérum virémique disponible. Un séquençage direct partiel du gène S a montré que les génomes étaient de génotype A2 et qu'il y avait 4 substitutions potentiellement impliquées dans l'échappement viral. Deux substitutions étaient présentes dans la plupart des génomes (signaux de séquençage direct non-ambiguës), K122R et D144E. K122R est une substitution polymorphique dans l'AgHBs mais très rare dans le génotype A2 et D144E est soupçonnée d'être un mutant d'échappement, même si la substitution d'un Asp par un Glu semble être minime. Deux substitutions étaient présentes dans certains génomes (signaux ambiguës), T143P et S154L dont les rôles possibles dans l'échappement viral sont inconnus. Les génomes ont été clonés et tous ont K122R/D144E, 1 clone ayant en plus S154L. Ce clone (2.2.11) et un clone K122R/D144E (5.9) ont été séquencés entièrement. Il n'y avait ni mutations de résistance aux antiviraux ni mutations core. Des transfections dans HuH7 ont montrées que les deux clones sont compétents pour la réplication mais présentent des perturbations dans l'expression des ARNm S, avec une surexpression pour le clone 5.9 et une inhibition pour le clone 2.2.11, qui sont reflétées dans la sécrétion des AgHBs.

L'inhibition de l'expression des ARNm S par le clone 2.2.11 peut être liée à une mutation présente dans ce clone, mais non pas dans le clone 5.9, qui empêche l'accumulation des ARNm PréS2/S. Une telle situation a déjà été décrite dans la réactivation d'une infection à VHB occulte chez un patient co-infecté par le VIH (Hass et al, Hepatology, 2005). Le clonage des séquences de l'AgHBs des 2 clones dans un vecteur d'expression a montré que les AgHBs mutés sont aussi bien reconnus qu'un AgHBs sauvage par au moins un test de détection commercial, ce qui pourrait remettre en cause l'importance de la mutation D144E dans le phénomène d'échappement viral. Pour connaître la ou les substitutions réellement impliquées dans cet échappement, nous avons introduit par mutagenèse dirigée les 4 substitutions dans un vecteur d'expression de l'AgHBs, individuellement ou en combinaison. Nous étudions la reconnaissance de ces AgHBs mutés par le sérum du patient, et nous présenterons les résultats à la réunion.

## **NOUVELLE STRATEGIE ANTIVIRALE: DES ARN NEGATIFS CONTRE LE VHC**

Juliette Bitard, Gaëlle Chognard, Estelle Dumas, Julie Rumi, Cyril, Masante, Thérèse Astier-Gin,  
et Michel Ventura. CNRS-Université Bordeaux 2 – UMR 5234 – IFR66

Cette présentation sera faite par Juliette Bitard.

Les thérapies actuelles contre l'Hépatite C sont confrontées à l'extrême variabilité virale. D'une part l'association interféron  $\alpha$  - ribavirine reste inefficace chez de trop nombreux patients et des variants résistants sont déjà attendus pour les nouvelles molécules en développement. Une autre stratégie de lutte contre le virus est donc indispensable. Nous avons développé une stratégie alternative qui consiste à délivrer un ARN « thérapeutique » destiné à ne s'exprimer que dans les cellules infectées par le VHC.

Cet ARN négatif non codant (le « minigénome ») est constitué d'un gène inséré en anti-sens entre les séquences complémentaires des UTR virales. Dans la cellule infectée, le complexe de réplication viral synthétisera un ARN codant à partir de cette matrice. Ainsi, la protéine d'intérêt sera sélectivement exprimée dans les cellules infectées, laissant les cellules saines intactes.

Cette stratégie a été abordée selon deux approches. La première utilise un gène codant pour la chaîne A de la ricine et vise à supprimer les cellules infectées, l'autre est basée sur l'emploi de l'interféron  $\alpha$  ou l'un de ces activateurs de transcription dans l'optique de faire disparaître l'ARN viral de la cellule infectée. Nous avons transfecté des cellules hébergeant le réplicon (génotype 1b) ou le virus JFH1 (génotype 2a) avec ces ARN. Dans ces deux modèles de la réplication virale, nous avons montré que ces minigénomes négatifs pouvaient, après 48h de culture, soit éliminer près de 50% des cellules lorsqu'ils codent pour la chaîne A de la ricine soit faire baisser de près de 60% la quantité d'ARN viral s'ils expriment l'IFN-  $\alpha$  ou RF-1.

Cette nouvelle approche utilisant des ARN négatifs non codants semble donc se révéler efficace. Elle est indépendante de la variabilité virale. En effet, seule la présence d'un complexe de réplication viral fonctionnel est nécessaire à l'expression des minigénomes. A l'exception des rétrovirus, il est envisageable de l'appliquer à la presque totalité des virus à ARN.

## HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS PLASMACYTOID DENDRITIC CELL-ASSOCIATED PRODUCTION OF INTERFERON ALPHA

Françoise Gondois-Rey (1,3); Clelia Dental (1,3); Philippe Halfon (4); Thomas F. Baumert (5); Daniel Olive (1,3); and Ivan Hirsch (1,3).

- (1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13009 Marseille
- (2) Institut Paoli-Calmettes, F-13009 Marseille
- (3) Université Méditerranée, 13007 Marseille
- (4) Department of Virology, Alphabio Laboratory, F-13006 Marseille, France
- (5) INSERM U748, Université Louis Pasteur, F-67000 Strasbourg, France

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are responsible for the production of type I IFN during viral infection. Viral elimination by IFN- $\alpha$ -based therapy in more than 50% of patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) suggests a possible impairment of production of endogenous IFN- $\alpha$  by pDCs in infected individuals. In this study, we investigated the impact of HCV on pDC function. We show that exposure of pDCs to patient serum- and cell culture-derived HCV resulted in production of IFN- $\alpha$  by pDCs isolated from some donors, although this production was significantly lower than that induced by influenza and human herpesvirus type 1 (HHV-1). Using specific inhibitors we demonstrate that endocytosis and endosomal acidification were required for IFN- $\alpha$  production by pDCs in response to cell culture-derived HCV. HCV and noninfectious HCV-like particles inhibited pDC-associated production of IFN- $\alpha$  stimulated with Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists (CpG-A or HHV-1) but not that of IFN- $\alpha$  stimulated with TLR7 agonists (resiquimod or influenza virus). The blockade of TLR9-mediated production of IFN- $\alpha$ , effective only when pDCs were exposed to virus prior to or shortly after CpG-A stimulation, was already detectable at the IFN- $\alpha$  transcription level 2 h after stimulation with CpG-A and correlated with down-regulation of the transcription factor IRF7 expression and of TLR9 expression. In conclusion, rapidly and early occurring particle–host cell protein interaction during particle internalization and endocytosis followed by blockade of TLR9 function could result in less efficient sensing of HCV RNA by TLR7, with impaired production of IFN- $\alpha$ . This finding is important for our understanding of HCV-DC interaction and immunopathogenesis of HCV infection.

Mis en forme : titre anrs,  
Gauche



Further studies defining the host cell molecules mediating HCVcc trafficking and cross-presentation by pDCs are in progress.

# REPONSE NEUTRALISANTE HUMORALE CONTRE LE VHC LORS DE LA COINFECTION PAR LE VIH ET DE LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE

G Maurin (1), AM Roque-Afonso (2), P Vaghefi (2), M Gigou (2), JC Duclos-Vallée (2), FL Cosset (1), D Samuel (2), D Lavillette (1), C Féray (3).

(1) INSERM U758, Ecole Normale Supérieure, Lyon

(2) INSERM U785, Hôpital Paul Brousse, Villejuif

(3) EA 4274, Institut des maladies de l'appareil digestif. CHU de Nantes.

## Introduction :

Les sujets coinfectés par le VIH et le VHC ont une maladie hépatique sévère et la transplantation hépatique (TH) conduit dans cette population à une récurrence accélérée (Duclos-Vallée, Hepatology, 2007). Le but de ce travail était de déterminer si la réponse humorale dirigée contre les protéines d'enveloppe du VHC (VHC pp) pouvait être modifiée par la coinfection avec le VIH et dans ce cas, par un traitement antirétroviral ou par la transplantation hépatique.

## Patients et méthodes :

40 patients prélevés avant, 6 et 12 mois après TH : 13 étaient mono-infectés, 15 étaient coinfectés par le VIH et le VHC et 12 coinfectés par le VIH et le VHB mais non par le VHC. Tous les transplantés VIH avaient un traitement antirétroviral avant et après TH. 13 patients non transplantés, coinfectés par le VIH prélevés avant et 12 mois après mise en route d'un traitement antirétroviral (n=8) ou en son absence (n=5). Le pouvoir neutralisant ou facilitant des plasmas était évalué après infection par 5 pseudoparticules virales portant des protéines d'enveloppe de différents génotypes (1a, 1b, 3, 4 et non-VHC) dans deux conditions expérimentales sur des cellules HuH7 et en triplicate.

## Résultats :

Les sérums des patients mono-infectés par le VHC entraînaient une neutralisation plus forte des diverses VHCpp testées (70%±24) que ceux des patients coinfectés par le VIH avant TH (25%±15) ou sans traitement anti-VIH (35%±25). Après TH, la neutralisation diminuait plus chez les coinfectés (15%±20) que chez les mono-infectés (50%±60) alors qu'elle augmentait (avec le taux de CD4) lors de l'introduction du traitement antirétroviral chez les patients non transplantés. Le pouvoir neutralisant du sérum des patients contrôles coinfectés par le VIH et le VHB et de ceux coinfectés par le VIH et le VHC après TH étaient inexistantes. Dans ces deux derniers groupes, une action facilitante du sérum était nette chez 5 sujets. Ces résultats étaient indépendants du dosage des LDL/HDL dans les plasmas testés.

Conclusion :

Chez le sujet infecté par le VHC, la réponse humorale contre l'enveloppe du VHC est nettement diminuée en cas de coinfection avec le VIH mais également par la transplantation hépatique. En revanche, la mise en route d'un traitement antirétroviral chez le sujet coinfecté induit une augmentation de la réponse humorale anti-VHC. Le mauvais contrôle humoral de l'infection VHC pourrait expliquer la sévérité de l'hépatite C en cas d'infection VIH, avant comme après TH.

## CRITICAL ROLE OF INTRA-HEPATIC CD4+CD25+FOXP3+ CELLS IN HCV INFECTED PATIENTS

Evelyne Jouvin-Marche (1,2) ; Nathalie Sturm (1,2,3) ; Marie-Ange Thélu (1,2) ; Xavier Camous (1,2) ; Guéorgui Dimitrov (1,2) ; Muhammad Ramzan (1,2) ; Tania Dufeu-Duchesne (1,2) ; Martine Pernollet (4) ; Christiane Guillermet (2,3) ; Philippe Arvers (5) ; Paula Bonorino (1,2) ; Vincent Leroy (1,2) ; and Patrice N. Marche (1,2).

(1) INSERM, Unité 823, Grenoble, France.

(2) Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut Albert Bonniot, UMR-S823, Grenoble, France.

(3) Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie, CHU A Michallon, 38043, Grenoble, France

(4) Etablissement Français du Sang de Grenoble, La Tronche, France.

(5) Centre de recherche de Service de Santé des Armées, La Tronche, France

In chronically infected patients, HCV-specific T-cell responses are often dysfunctionnal. The mechanisms of this dysfunction remain unclear but recent studies suggest a major contribution of regulatory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells. In vitro data point out that regulatory T cells (T<sub>regs</sub>) are able to suppress HCV-specific lymphocytes proliferation and cytokines secretion but their implication in this pathology is still debated. In order to document this point, we studied frequency and localization of FoxP3<sup>+</sup>T<sub>regs</sub> in the liver of HCV infected patients. Flow cytometric data show the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells in liver compartment while intra-hepatic CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells were scarce. Precise immunohistochemical localization of these cells in 20 liver biopsies show that they are present in necrotic areas in close contact with CD8<sup>+</sup> lymphocytes suggesting that T<sub>regs</sub>-mediated inhibition of HCV-specific CD8<sup>+</sup>T cells proliferation requires direct cell-cell contact at the inflammatory site. The analysis of expression levels of cytokines reveals a strong correlation between CD8, FoxP3 and IL-10 while no correlation was found between serum viral load and any transcripts encoding for immune markers. Interestingly the ratio of CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> cell remains similar in both low and mild fibrosis while this ratio differs significantly in severe stages of the disease. On the light of these observations, the most likely scenario is that, during the first step of the disease, FoxP3<sup>+</sup> cells modulate effectors functions of lymphocytes whereas, during the severe stage, the co-dependency between FoxP3<sup>+</sup> cells and effectors cells is broken. Therefore, facing the immune response and the equilibrium FoxP3-CD8 cells, the stage/grade A2/F3 appears to be a turning point in the course of the disease.

Taken together, our work provides new insights into the distribution of regulatory T cells in the different histological areas within HCV infected liver, the regulation being essentially FoxP3-CD8 contact-dependent .and suggests that the essential role of T<sub>regs</sub> is to limit the CD8 cells pool in order to contain the damage that could be occurred within the liver. These findings are crucial for understanding the HCV immune pathogenesis and for immunotherapeutic treatments.

# ÉTUDE DE L'ENCAPSIDATION DU GENOME DU VHC PAR MESURE DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTEINE CORE ET L'ARN VIRAL AU MOYEN D'UN VECTEUR LENTIVIRAL EX VIVO

Piver E. (1) ; Caval V. (1) ; Ivanyi-Nagy R. (2) ; Collin C. (1) ; Darlix JL. (2) ; Pagès JC (1).

(1) INSERM U 966, Faculté de Médecine, 10 Bld Tonnellé 37032 Tours.

(2) LabRetro U 758 Ecole Normale Supérieure de Lyon 69634 Lyon.

Les modèles actuels d'étude de la réplication du Virus de l'Hépatite C (VHC) sont peu adaptés à l'étude des mécanismes d'encapsidation du génome viral. Le groupe de JL Darlix a mis en évidence, *in vitro*, une interaction du domaine N-terminal de la protéine Core avec la séquence 3' non codante de l'ARN du VHC *in vitro* (Cristofari *et al.*, 2004). Pour reproduire cette interaction dans un système cellulaire, nous avons développé un modèle d'encapsidation hétérologue du génome viral du VHC. Le recrutement de génome HCV est étudié dans des particules virales dérivées du VIH-1. Pour obtenir cette hétéro-encapsidation nous avons construit des protéines de fusion Vpr-Core. La première comporte la séquence complète de la protéine Core et sert de référence. Pour déterminer le domaine minimal d'interaction de la Core avec l'ARN viral, nous avons généré d'autres protéines de fusion par délétions successives, du domaine C-terminal de la Core puis des domaines basiques. L'étude de la capacité de la protéine Core, et de ses mutants, à recruter spécifiquement le génome du VHC, est réalisée dans les cellules hébergeant un réplicon sub-génomique du VHC exprimant la résistance à la néomycine. Ces cellules sont co-transfectées par trois systèmes d'expression. Le premier code la protéine de fusion Vpr-Core, les deux autres permettent la production de particules lentivirales contenant la fusion Vpr-Core et d'une enveloppe amphotrope. Le surnageant de ces cellules est récolté pour une analyse quantitative de son contenu en ARN du réplicon HCV et, par transduction, de la capacité de mobilisation de ces mêmes réplicons.

Après s'être assuré de l'expression des différentes protéines de fusion, nous avons pu mettre en évidence une mobilisation lentivirale des réplicons HCV sub-génomiques. Ce phénomène est spécifique, les réplicons ne sont recrutés qu'en présence de la fusion Vpr-Core. Par PCR en temps réel nous mesurons l'efficacité de recrutement des différents mutants. Les réplicons mobilisés sont fonctionnels, après transduction de cellules cibles naïves, nous obtenons des clones cellulaires exprimant les réplicons.

L'ensemble de nos résultats indique la pertinence de l'approche pour l'étude du mécanisme d'encapsidation du génome viral. Par mutagenèse du domaine 1 nous avons entamé la caractérisation des résidus de la Core impliqués dans l'interaction avec le génome viral.

Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne JP, Penin F, Darlix JL. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(8):2623-31

## L'IRES DU VHC INTERAGIT AVEC LE MOTIF DE RECONNAISSANCE MRR DE LA SOUS UNITE B DU FACTEUR D'INITIATION EIF3

Julien Pérard (1) ; Rodolfo Rasia (2) ; Jan Medenbach (3) ; Isabel Ayala (2) ; Jérôme Boisbouvier (2) ; Emmanuel Drouet (1) and Florence Baudin (1,3).

(1) Unit of Virus Host Cell Interactions, UVHCI, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS & (2) Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France. (3) EMBL Heidelberg, Germany.

L'IRES (Internal Ribosome Entry Site) du VHC est agencé en une structure secondaire complexe hautement conservée qui comprend quatre domaines distincts (I-IV). Cette organisation permet la liaison directe du facteur d'initiation eucaryote eIF3 et de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'ARN. Cette stratégie permet au virus de court-circuiter le recrutement des autres facteurs eucaryotes au profit de la traduction des ARN viraux. Cependant, les bases moléculaires de l'assemblage de ce complexe restent énigmatiques. Une analyse bio informatique des différentes sous-unités du complexe eIF3 (dix sous-unités) a révélé la présence de deux motifs de reconnaissance à l'ARN (MRR) : l'un au niveau de la sous-unité eIF3b :185-268 et l'autre sur eIF3g : 239-317. Afin de déterminer le rôle de ces motifs, le complexe eIF3, la protéine eIF3b et les domaines MRR de ces protéines ont été étudiés par la méthode de Filter Binding Assay (FBA), en interaction sur différentes constructions d'IRES VHC. Nous avons pu caractériser les constantes de dissociation entre : eIF3/IRES (Kd 5nM), eIF3b/IRES (Kd 2 $\mu$ M) et eIF3b-MRR (Kd 2 $\mu$ M). Ces résultats confirment l'implication du domaine eIF3b-MRR dans une interaction eIF3-IRES. De plus, ces résultats complètent les données publiées par d'autres équipes et montrent que eIF3b se lie directement au domaine III de IRES *via* son N-terminal-MRR. Après avoir validé le rôle de ce domaine dans l'interaction avec l'IRES du VHC, nous avons utilisé la spectroscopie RMN afin d'identifier les acides aminés impliqués dans la reconnaissance de l'ARN viral. Nous avons pu identifier neuf résidus impliqués dans cette interaction et situés au niveau des feuillets :  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 et  $\alpha$ 5. Par ailleurs nous avons réussi à inhiber spécifiquement la formation du complexe eIF3b-MRR/IRES grâce à un anticorps monoclonal spécifique du domaine eIF3b-MRR. Ces résultats préliminaires nous permettront de réaliser des épreuves d'inhibition afin de sélectionner une série de « small molecules » inhibitrices de l'interaction. Enfin, dans le but de mieux comprendre l'assemblage de chaque partenaire, nous avons utilisé la technique SAXS (Small Angle X-Rays Scattering), qui nous a permis de caractériser pour la première fois la dimension moléculaire de l'IRES libre en solution. Les données de SAXS seront utilisées afin de générer un modèle de l'IRES (libre ou en complexe) à une résolution quasi atomique. La résolution structurale de ce complexe RiboNucleoProtéique particulier impliqué dans la traduction du VHC aidera à mieux comprendre les phases initiales de la traduction initiale du VHC.

Travail soutenu par ANRS - Accepté pour publication à FEBS letters

# **ETUDE STRUCTURALE DE LA POLYMERASE MEMBRANAIRE DU VIRUS DE L'HEPATITE C. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA POLYMERASE ENTIERE**

C. Caillet-Saguy (1), N. Scrima (1), V. Lohmann (2) et S. Bressanelli (1)

(1) Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

(2) Department of Molecular Virology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

La production de particules virales infectieuses du virus de l'hépatite C (HCV) en culture cellulaire dépend des propriétés uniques de la souche JFH1 de génotype 2a. Les autres souches de HCV sont incapables de se répliquer de manière autonome en culture cellulaire même des souches très voisines du même génotype. Récemment, Wakita et collaborateurs (2007) ont mis en évidence que les propriétés particulières de cette souche JFH1 étaient dues principalement à la protéine non structurale NS5B.

L'ARN polymérase dépendante de l'ARN NS5B est associée à la membrane par un segment transmembranaire C-terminal de 21 résidus. Le domaine catalytique N-terminal est séparé de cette ancre membranaire par une quarantaine de résidus. Ce connecteur est replié dans la crevasse catalytique dans les structures cristallographiques de NS5b (toutes déterminées sur des constructions solubles dépourvues de l'ancre membranaire). Cette organisation impliquerait d'une part une auto-inhibition de l'enzyme et d'autre part une proximité de la membrane au sillon d'entrée de l'ARN matrice *in vivo*.

Afin d'élucider les mécanismes d'activation de NS5b, nous avons entrepris l'étude structurale de NS5b entière (NS5b-fl). Nous avons mis au point un protocole de production et de purification en détergent de JFH1-NS5b-fl qui nous permet 1) d'obtenir de grandes quantités (plusieurs milligrammes) de protéine pure ; 2) de choisir le détergent dans lequel la protéine est maintenue soluble en fin de purification. Nous sommes donc à même de débiter l'étude structurale par cristallographie aux rayons X (en détergent) et par microscopie électronique (en détergent et après réinsertion de NS5b-fl dans une bicouche lipidique plane).

Nous présenterons le protocole optimisé de production et purification de JFH1-NS5b-fl et éventuellement son application à d'autres souches de HCV et les premiers résultats structuraux sur NS5b-fl.

# **DESCRIPTION D'UNE INSERTION V3-LIKE DANS LE GENE NS5A DU VIRUS DE L'HEPATITE C DE GENOTYPE 1B CHEZ DES PATIENTS CHRONIQUEMENT INFECTES**

Odile Petsaris, S. Vallet, C. Payan,  
Laboratoire de Bactériologie-Virologie, E.A. 3882, CHU Morvan, Brest.

## Introduction :

La protéine non structurale NS5A du virus de l'hépatite C a été impliquée dans la résistance au traitement par l'interféron alpha (IFN) chez des patients atteints d'hépatite chronique C, infectés par des virus de génotype 1b. Au Japon, la présence de mutations dans la région ISDR a été associée à la réponse au traitement par l'interféron. Les études menées en Europe n'ont pas confirmé ces résultats, mais il a été montré que des mutations dans la région carboxy-terminale V3 de la protéine pouvaient être associées à la réponse au traitement. Les fonctions de la région variable V3, dans la formation du complexe de réplication virale et dans ses multiples interactions avec les protéines cellulaires de l'hôte, ne sont pas encore bien connues. Dans cette étude, nous décrivons une insertion dans le domaine V3 (2353-2379) de la protéine NS5A. Pour explorer l'éventuelle relation entre cette insertion et une évolution clinique particulière de la pathologie induite par le VHC, nous avons déterminé la prévalence de cette insertion et sa variabilité (quasi-espèce virale) chez 4 groupes de patients de statuts cliniques différents.

## Patients et méthodes :

Les sérums ont été collectés auprès de 74 patients mono-infectés par le VHC de génotype 1b, naïfs de tout traitement antiviral et inclus dans la cohorte française d'étude de l'incidence du carcinome hépatocellulaire (Pr. Trinchet, Hôpital Jean Verdier, Bondy). Quatre groupes de patients ont été définis. Le groupe 1 comprenait 19 patients atteints de fibrose F1-F2 selon le score METAVIR, le groupe 2, 27 patients atteints de cirrhose virale C (F4), le groupe 3, 9 patients cirrhotiques (F4) d'évolution ultérieure connue vers un carcinome hépatocellulaire (CHC), le groupe 4 comportait 19 patients atteints de CHC constitué. Après extraction et rétro-transcription, le domaine V3 du gène NS5A a été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide d'amorces spécifiques. Après analyse par électrophorèse, les produits de PCR contenant une insertion ont été directement séquencés. La quasi-espèce virale a été étudiée chez ces mêmes patients après clonage, avec pour objectif d'obtenir 30 clones par patient, suivi du séquençage des clones d'intérêt.

## Résultats :

Parmi les 74 sérums analysés, 5 insertions ont été détectées, toutes chez des patients cirrhotiques, dont 2 dans le groupe F4 et 3 patients dans le groupe F4, d'évolution vers le CHC connue. L'insertion est conservée chez 2 patients (groupe 2, groupe 3) prélevés à 7 ans d'intervalle. Chez ces 5 patients, le séquençage direct du domaine V3 a montré une insertion de 31 acides aminés (93 nucléotides),

situés en aval du domaine V3 initial, sans codon stop, ni décalage du cadre de lecture. Par rapport à la souche de référence HCV-J et au domaine initial V3, cette insertion présente une homologie en acides aminés variant selon les patients de 63% à 89%, suggérant une duplication de ce dernier. Pour étudier les quasi-espèces de la région NS5A V3 (218 nucléotides), 178 clones ont été obtenus, soit une moyenne de 25 clones par patient, puis séquencés et analysés. Sur les 178 séquences obtenues, 167 étaient de 312 nucléotides et correspondaient au domaine V3 dupliqué, 11 séquences étaient de 218 nucléotides (V3 non dupliqué). Un codon stop a également été identifié dans deux clones issus d'un patient cirrhotique. L'arbre phylogénique construit à partir de l'alignement des 178 séquences ne montre pas de répartition spécifique liée au statut clinique des patients.

Conclusion :

Ce travail permet de décrire une insertion de type V3-like dans la région carboxy-terminale de la protéine NS5A du VHC, encore non publiée dans la littérature. L'étude des quasi-espèces virales a montré une hétérogénéité des séquences. Le mécanisme et les conséquences de cette duplication sont sujettes à discussion.

## **EFFETS FONCTIONNELS DES FORMES SECRETEES DU PRODUIT DU GENE PREC DU VHB SUR LES LYMPHOCYTES T.**

Purvina M., Hoste A., Rossignol J.M. et C. Lagaudrière-Gesbert.

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire UMR CNRS/UVSQ/EPHE 8159.

Université Versailles St Quentin.

Le rôle des produits du gène préC du virus de l'Hépatite B humaine (VHB) dans l'établissement de la persistance virale n'est actuellement que partiellement compris, notamment en ce qui concerne les formes sécrétées P20<sup>(1)</sup> et HBe. Notre objectif est d'évaluer les effets de ces protéines sécrétées sur les cellules effectrices du système immunitaire. En effet, l'établissement d'une persistance virale implique que le virus a développé des stratégies lui permettant de contrer les défenses immunitaires de l'hôte et de maintenir son génome dans les cellules infectées. L'infection chronique par le VHB étant associée à une réponse lymphocytaire T défectueuse<sup>(2)</sup>, notre intérêt c'est porté sur ces cellules immunes.

A l'aide de protéines virales recombinantes, fusionnées à différentes étiquettes (Glutathion S transférase, (His)<sub>6</sub> et Streptavidin Binding Peptide), une inhibition spécifique de la prolifération des lymphocytes T a pu être observée. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules mononucléées du sang périphérique fraîchement purifiées dont l'activation a été induite par des agents mitogènes (concanavalin A). Cette inhibition est comparable à l'inhibition décrite pour la protéine de capsid du virus de l'Hépatite C humaine (VHC). Nos résultats suggèrent donc que ces deux virus pourraient utiliser des stratégies similaires pour perturber les fonctions lymphocytaires T. Parallèlement à ces études fonctionnelles, la recherche et l'identification de protéines de surface capables d'interagir avec HBe et P20 ont été entreprises par une approche biochimique. Des extraits membranaires préparés à partir de cellules de la lignée T Jurkat ont été soumis à des tests de co-rétention protéiques avec les protéines virales recombinantes. Les protéines de surface spécifiquement retenues par HBe et P20 sont actuellement en cours d'analyse.

<sup>(1)</sup> Messageot, F., Salhi, S., Eon, P. and Rossignol, J.M. (2003) *J Biol Chem*, 278, 891-895..

<sup>(2)</sup> Maini, M.K. Boni, C., Lee, C.K., Larrubia, J.R., Reignat, S., Ogg, G.S., King, A.S., Herberg, J., Gilson, R., Alisa, A., Williams, R., Vergani, D., Naoumov, N.V., Ferrari, C. and Bertolotti, A.. (2000). *J Exp Med*, 191, 1269-1280.

# **ETUDE DES REPONSES IMMUNITAIRES INDUITES PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C : UTILISATION DE PUCES A PEPTIDES ET A PROTEINES**

S. CORTES (1); C. BRAKHA (1); A. BUHOT (2); J.P. Zarski (1,3); P.N. MARCHE (1,3); et M-B VILLIERS (1)

(1) INSERM, U823; Université J Fourier IAB/IAPC-Grenoble-France; (2) CNRS,U5819, CEA-Grenoble; (3) Hôpital Michallon, CHU-Grenoble.

OBJECTIFS : Le thème de nos travaux est l'étude des réponses immunitaires, humorale et cellulaire, induites par le virus de l'hépatite C (VHC). Les objectifs sont les suivants :

- 1) Une étude sérologique de patients dans le but de déterminer des indicateurs pronostiques sur l'évolution et les réponses aux traitements des hépatites virales C. Cette étude est faite sur des patients à différents stades de la maladie à l'aide d'un système miniaturisé de type puce à peptides.
- 2) Développer une puce à protéines permettant de détecter rapidement, directement et spécifiquement des cellules. Ce système permettra d'étendre l'analyse des paramètres immunologiques aux prélèvements de sang et aux biopsies hépatiques.

METHODES : Des molécules sondes (peptides ou protéines) sont greffées sur une puce constituée d'un prisme de verre recouvert d'un film d'or. L'immobilisation est réalisée par électrocopolymérisation d'un monomère conducteur électronique, le pyrrole. Des molécules ligands sont ensuite injectées (sérums de patients infectés par le VHC ou cellules) sur cette puce et la détection des interactions se fait par une méthode optique basée sur l'imagerie de la résonance plasmonique de surface (SPRi) permettant une mesure en temps réel et sans utilisation de marqueur.

RESULTATS : Etude de la réponse humorale : analyse du « profil anticorps » chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C. Nous avons développé un système miniaturisé constitué d'une puce greffée avec des peptides correspondants à des épitopes potentiels du VHC, déduits des protéines Enveloppe, Core, et non-structurales. Le système est compatible avec l'analyse d'échantillons biologiques complexes (sérum) et permet la quantification des anticorps spécifiques des différents épitopes. Une analyse de 48 sérums de patients sur 58 peptides greffés permet la définition de profils anticorps. La puce peut-être régénérée, permettant ainsi de tester successivement un grand nombre de sérums. Une analyse statistique et une modélisation mathématique de ces profils est en cours pour rechercher des corrélations avec le tableau clinique des patients.

Etude de la réponse cellulaire : Développement d'une puce à protéines pour la détection cellulaire. Nous avons mis au point une méthodologie applicable à la détection de cellules par des puces à protéines en adaptant la technique utilisée dans les études des interactions protéines-protéines. Ce

travail a été réalisé avec des lignées cellulaires murines (lymphocytes B et T). Des anticorps dirigés contre des molécules de surface présentes sur les lymphocytes B ou T sont immobilisés sur une puce. Un anticorps IgG contrôle permet d'observer les interactions non spécifiques. Après injection de lymphocytes B ou T, nous observons une interaction spécifique entre les anticorps greffés et les molécules de surface. Nous distinguons très peu de cellules fixées sur les plots contrôles. Les résultats obtenus indiquent que ce système permet la détection d'interactions spécifiques entre des anticorps et des cellules, tout en préservant leur viabilité. Le seuil de sensibilité obtenue avec une telle puce est de 10 000 cellules, offrant la possibilité d'analyser des échantillons de faible taille tels que des biopsies hépatiques.

CONCLUSIONS : Nous avons mis au point une méthode de monitoring immunologique performante compatible avec l'analyse d'échantillons complexes (sérums, mélanges de cellules) et adaptée à l'analyse des anticorps et à la détection spécifique de cellules. Cette méthodologie présente de nombreux avantages, i.e. bonne spécificité, analyse multiparamétrique (détection simultanée de plusieurs épitopes ou types de cellules), analyse en temps réel ne nécessitant pas de marquage, régénération possible de la surface de la puce. Elle constitue un outil prometteur pour l'analyse rapide et multiparamétrique des réponses immunitaires induites par l'infection par le VHC.

# EFFET INHIBITEUR ET CALCINEURINE INDEPENDANT DE LA CYCLOSPORINE A SUR LES CELLULES T REGULATRICES CD4+CD25+ HUMAINES IN VITRO

C. Miroux (1), O. Moralès (1), A. Carpentier (2), S. Dharancy (3), F. Conti (2), E. Boleslowski (3), P. Podevin (2), C. Auriault (4), V. Pancré (1), N. Delhem (1).

(1) UMR 8161- Institut de Biologie de Lille (Lille); (2) UPRES 1833 Hôpital Cochin (Paris); (3) Inserm U795 Hôpital Huriez (Lille); (4) UMR 6097 Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (Sophia Antipolis).

## Introduction :

Le carcinome hépatocellulaire lié à l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente l'indication la plus fréquente de transplantation hépatique. Cependant, il existe deux problèmes majeurs liés à la transplantation hépatique : (i) la réinfection virale du greffon qui est quasi systématique, et (ii) le rejet du greffon qui est partiellement maîtrisé par les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) et par l'administration d'immunosuppresseurs (IS). Les immunosuppresseurs et les Treg, sont tous 2 capables de favoriser la récidence. Et paradoxalement, certains IS, et en particulier la Cyclosporine A (CsA), ont été associés à des épisodes de rejet aigu d'allogreffe plus fréquents.

## Méthodes :

Les Lymphocytes T régulateurs humains CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont isolés à partir du sang de donneurs sains et cultivés en présence de 40 ou 400 ng/mL de CsA, ou d'un analogue non immunosuppresseur de la CsA dont l'activité est indépendante de la calcineurine : *NIM811*. L'activité suppressive des cellules T régulatrices est analysée dans des MLR de CD25<sup>+</sup> et de PBMC autologues activées, en présence ou non des drogues. Le phénotype des Treg est analysé par cytométrie en flux et PCR quantitative en temps réel et leur sécrétion cytokinique est quantifiée par ELISA.

## Résultats :

La CsA et *NIM811*, utilisés à 40 et 400 ng/mL, inhibe la prolifération des PBMC et des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, de manière dose dépendante. De manière intéressante, l'ajout de 40 ng/mL de CsA dans la MLR inhibe l'activité suppressive des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, alors qu'une forte dose de CsA (400 ng/mL) n'a pas d'effet sur l'activité des Treg. Nous avons montré qu'une faible concentration de CsA (40 ng/mL) ne modifiait pas le phénotype des Treg mais altérait leur activité suppressive en modifiant leur profil de sécrétion cytokinique au profit de cytokine pro-inflammatoire de type Th1. Par ailleurs, son analogue *NIM811* a le même effet inhibiteur sur l'activité suppressive des Treg à faible dose.

Conclusions :

La CsA inhibe significativement la fonction des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en induisant une sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, il semblerait que cette inhibition soit indépendante de la calcineurine, dans la mesure où *NIM811*, qui est également capable d'inhiber l'activité des Treg, a un mécanisme d'action ne passant pas par l'inhibition de la calcineurine. Cette étude suggère donc qu'une dose thérapeutique de CsA, indépendamment de la calcineurine, pourrait bloquer l'induction d'une tolérance immunitaire et diminuer le risque de récurrence de l'hépatite C.

# **POTENTIALISATION DE LA RÉPONSE HUMORALE NEUTRALISANTE DU VACCIN À ADN DIRIGÉ CONTRE LE DHBV PAR CO-ADMINISTRATION DE GÈNES CODANT POUR DES CYTOKINES**

Fadi Saade (1) ; Fabien Abdul (1) ; Thierry Buronfosse (1,2) ; Pierre Pradat (3) ; Lucyna Cova (1)

(1) INSERM Unité 871, Lyon, France ; (2) Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon, France ; (3) Département d'hépatologie, Hôtel-Dieu, Lyon, France.

L'immunisation par ADN est une stratégie pertinente pour la thérapie des infections chroniques par l'HBV, mais il serait intéressant d'améliorer son efficacité antivirale. Des données expérimentales obtenues chez la souris et la marmotte américaine suggèrent que l'amplitude et la qualité des réponses immunes induites par des vaccins à ADN ciblant l'HBV peuvent être augmentées par la co-administration de gènes codant des cytokines comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et l'interleukine-2 (IL-2). Cependant, la capacité neutralisante des anticorps générés n'a jamais été explorée. Dans cette étude, nous avons exploré, dans le modèle de l'hépatite B du canard (DHBV), l'effet de la co-administration de gènes codant pour les cytokines du canard IFN- $\gamma$  et IL-2 sur la réponse humorale neutralisante induite par un vaccin à ADN codant pour la grande protéine d'enveloppe du DHBV.

Des canards de Pékin non infectés, âgés de 6 semaines, ont reçu, par injection intramusculaire, aux semaines 0, 3, 7 et 16, un plasmide codant pour la protéine preS/S seule ou en co-administration avec un plasmide codant pour l'IFN- $\gamma$  ou pour l'IL-2.

Les résultats ont montré que la co-administration de plasmides codant soit pour l'IFN- $\gamma$  ou pour l'IL-2 augmentait considérablement l'amplitude des réponses anti-preS par rapport aux animaux immunisés avec le plasmide codant uniquement pour la grande protéine d'enveloppe. De plus, l'étude de la neutralisation du DHBV en culture primaire d'hépatocytes a montré que la co-administration de plasmides codant pour l'IFN- $\gamma$  ou pour l'IL-2 a induit un pouvoir neutralisant plus élevé comparé à celui observée avec l'immunisation par le plasmide codant uniquement pour la protéine preS/S.

La comparaison du pouvoir neutralisant des sérums des animaux co-immunisés a montré que la co-administration d'IFN- $\gamma$  a conduit à une diminution marquée de la quantité résiduelle de virus comparée aux animaux co-immunisés avec l'IL-2 indiquant un bénéfice significatif ( $P < 0.001$ ) de l'IFN- $\gamma$  sur le pouvoir neutralisant des anticorps anti-preS générés lors d'une vaccination à ADN nu. Cette approche n'a pas induit d'effets toxiques chez les animaux traités.

En conclusion, nos résultats ont montré que la co-administration de plasmides codant pour des cytokines, plus particulièrement l'IFN- $\gamma$ , augmente de façon significative, les réponses humorales neutralisantes générés contre la protéine d'enveloppe du DHBV. Ces résultats prometteurs suggèrent le bénéfice d'une telle stratégie pour le développement de protocoles immunothérapeutiques, à base du vaccin à ADN nu pour le traitement des infections chroniques par le HBV.