

Culture du virus de l'hépatite C, enfin !

Florence Legrand-Abravanel, Jacques Izopet

Inserm, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300, France ; CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de virologie, Institut fédératif de biologie de Purpan, F-31300, France. izopet.j@chu-toulouse.fr

> Après la découverte du virus de l'hépatite C (VHC) en 1989, il a fallu attendre 16 ans pour disposer d'un système permettant la propagation du virus et la production de particules virales *in vitro*. La première étape fut la génération de réplicons subgénomiques. Cependant, ce système n'aboutissait pas à la production de virions infectieux et permettait uniquement l'étude de la phase intracellulaire du cycle répliatif. L'identification d'une souche particulière qui, pour des raisons encore inconnues, se répliquait à un niveau élevé dans des lignées hépatocytaires humaines a constitué une avancée décisive. Ce nouveau système permet à présent l'étude du cycle cellulaire du VHC, élément essentiel pour le développement de nouveaux antiviraux.

Le VHC infecte 170 millions d'individus dans le monde et représente l'un des agents principaux de maladie chronique du foie. Six génotypes et de nombreux sous-types ont été décrits. Cette variabilité a des conséquences thérapeutiques puisque les différents génotypes ne présentent pas la même sensibilité au traitement [1]. Comme les autres *Flaviviridae*, le VHC est un virus enveloppé et est constitué d'un génome à ARN simple brin de polarité positive (Figure 1A). Sa biologie restait mal connue car le chimpanzé était le seul modèle animal et aucun modèle de culture cellulaire ne permettait un cycle répliatif complet.

Différentes stratégies ont été successivement développées. Par analogie aux travaux réalisés sur le poliovirus, des constructions subgénomiques

composées seulement des gènes non structuraux du VHC ont été réalisées (Figure 1B) et leur transfection dans la lignée d'hépatome humain Huh-7 a permis une répliation autonome [2]. D'autres travaux ont confirmé ces résultats et ont montré qu'un niveau élevé de répliation était lié d'une part à des mutations adaptatives localisées dans les régions NS3 et NS5A, et d'autre part à l'existence de clones cellulaires hautement permissifs : Huh-7.5 et Huh-7 Lunet [3]. Ces éléments ont permis la construction de réplicons du VHC comportant le génome entier, mais aucun réplicon génomique ne permettait la production de particules virales infectieuses. De plus, il a été montré que les mutations adaptatives favorisant la multiplication *in vitro* étaient en fait délétères pour l'infectiosité *in vivo* chez le chimpanzé [4].

L'année 2005 aura été déterminante pour la mise au point d'un système cellulaire permettant de reproduire un cycle infectieux complet du VHC *in vitro*. Une étape essentielle fut la construction d'un clone consensus de génotype 2a, isolé d'un patient japonais présentant une hépatite fulminante, forme clinique exceptionnelle dans les hépatites C. Ce clone fut appelé JFH1. Un réplicon subgénomique de JFH1 présentait des niveaux de répliation plus élevés que les précédents, sans mutation adaptative [5]. Point crucial, la transfection du génome complet de JFH1 dans les cellules Huh-7 a permis la production de particules virales infectieuses dont l'infectiosité a été démontrée à la

fois sur des lignées hépatocytaires et chez le chimpanzé [6]. Une autre innovation de ce système fut la possibilité d'accroître les titres du virus JFH1 en utilisant des cellules traitées par de l'interféron- γ [7]. Les cellules Huh7.5 semblent constituer le système le plus favorable à la production virale *in vitro*. Ces cellules présentent une mutation dans le gène RIG-I, conduisant à l'inactivation des réponses immunes innées antivirale [8]. La culture d'un virus de génotype 1a a pu être réalisée mais la production de virus infectieux était inférieure à celle de la souche JFH1 [9].

La production de particules virales infectieuses à partir d'un génome VHC chimère résultant du remplacement des gènes C, E1, E2 et NS2 de JFH1 par la séquence correspondante du virus J6 (génotype 2a) a été également décrite (Figure 1C) [10]. Ce virus chimère est infectieux chez le chimpanzé et après passage chez cet animal le virus reste infectieux en culture cellulaire [11]. De plus, la répliation est inhibée par l'interféron- α et les titres viraux obtenus avec ce virus chimère sont plus élevés qu'avec JFH1. Les gènes structuraux de JFH1 semblent donc présenter une plus faible capacité intrinsèque d'assemblage et/ou de libération du virus. Cette hypothèse est étayée par une étude récente où la production en culture de virus chimères intergénomiques et intragénomiques a été comparée à celle de JFH1 (Figure 1D) [12]. Les titres les plus élevés ont été obtenus avec le recombinant J6-JFH1. L'étude de ces virus chimères a permis récemment l'identification de déterminants essen-



tiels à la production de virus *in vitro* [13]. Afin de produire en culture des virus de différents génotypes, d'autres constructions comportant l'ADN complémentaire du VHC flanqué par des structures ribozymes ont été réalisées mais les niveaux de répllication restent cependant faibles [14]. Il est intéressant de noter que les rares virus recombinants décrits *in vivo* chez des patients chroniquement infectés présentent un point de cassure localisé à la jonction NS2-NS3 et sont constitués des gènes structuraux de génotype 2 [15-17].

Le modèle de culture cellulaire du VHC avec la souche JFH1 constitue donc un événement majeur permettant l'étude *in vitro* du cycle viral dans son ensemble et la confirmation des données établies précédemment à partir d'autres modèles. Ce système a récemment contribué à la caractérisation d'un nouveau récepteur impliqué dans l'entrée du VHC : la claudine-1 [18]. Cependant, malgré tout l'intérêt de la culture conventionnelle pour l'analyse détaillée de la biologie du VHC, les études concernent principalement le génotype 2a ou des constructions dérivées de ce génotype. Le dévelop-

pement de génomes chimériques, comportant les éléments structuraux et non structuraux de l'ensemble des génotypes, reste un enjeu essentiel. ♦

A new system for the culture of hepatitis C virus

RÉFÉRENCES

1. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000 ; 13 : 223-35.
2. Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; 285 : 110-3.
3. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003 ; 77 : 3181-90.
4. Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, et al. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 14416-21.
5. Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1808-17.
6. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-6.
7. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 9294-9.
8. Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E Jr, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005 ; 79 : 2689-99.
9. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, et al. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 2310-5.
10. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005 ; 309 : 623-6.
11. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 3805-9.
12. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 7408-13.
13. Binder M, Quinkert D, Bochkarova O, et al. Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J Virol* 2007 ; 81 : 5270-83.
14. Kato T, Matsumura T, Heller T, et al. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 2007 ; 81 : 4405-11.
15. Kalina O, Norder H, Mukomolov S, et al. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002 ; 76 : 4034-43.
16. Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, et al. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 2006 ; 80 : 7569-77.
17. Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, et al. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 2007 ; 81 : 4357-62.
18. Evans MJ, von Hahn T, Tschernig DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007 ; 446 : 801-5.

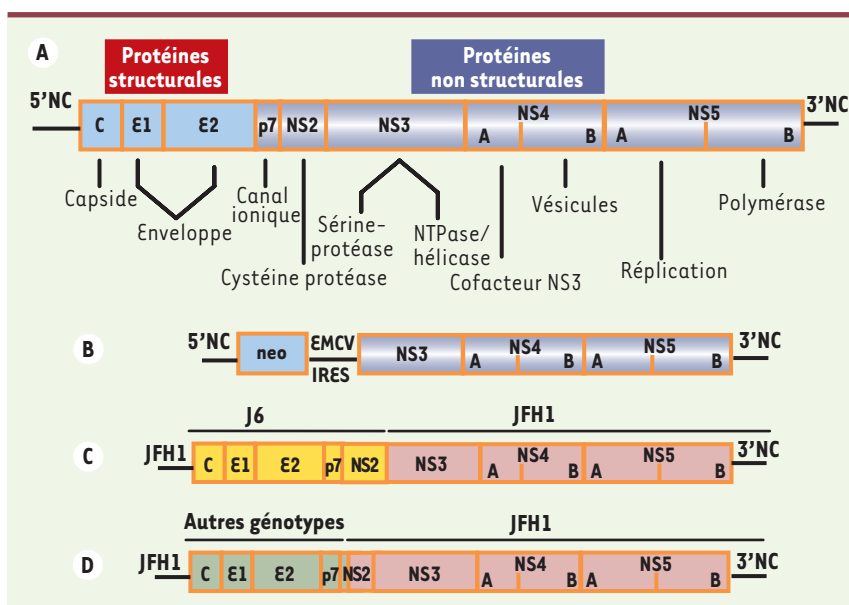


Figure 1. Organisation du génome du virus de l'hépatite C et structure des réplicons ou des génomes infectieux. **A.** Représentation schématique du génome viral. La fonction des protéines clivées est indiquée. C est la protéine de capsid, E1 et E2 sont les glycoprotéines d'enveloppe, p7 forme un canal ionique impliqué dans la répllication du virus, NS2 est une cystéine protéase, NS3 forme un complexe stable avec NS4A créant une sérine protéase alors que son domaine carboxy-terminal contient une activité de phosphatase des nucléotides et une activité hélicase. NS4B peut induire la formation de vésicules intracellulaires servant de support à la répllication du virus. La phosphoprotéine NS5A est un co-facteur de répllication. NS5B est l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. **B.** Structure des réplicons subgénomiques. La traduction du gène *neo* (conférant la résistance à G418) est sous la dépendance de l'IRES du HCV alors que les autres protéines sont sous la dépendance du site d'entrée dans le ribosome (*internal ribosomal entry site*, IRES) du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). **C.** Représentation schématique du virus chimère construit par Lindenbach *et al.* La région comprise entre le gène de capsid et NS2 est dérivée de la souche J6 (génotype 2a), les autres régions du génome appartiennent à la souche JFH1 (génotype 2a). **D.** Représentation schématique des virus chimères construits par Pietschmann *et al.* Les fragments génomiques ont été fusionnés immédiatement après le premier domaine transmembranaire de NS2.